

بررسی تغییرات سطوح بیانی ژن‌های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4*

در بافت معده بیماران مبتلا به گاستریت

Examining of relative alternations in the expression of *CHEK2*, *DCLRE1C* and *XRCC4* genes in patients with Gastritis

امیراتابک رجایی^۱، علی رشیدی‌نژاد^{۲*}، مسعود آل‌بویه^۳، رضا شیرکوهی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تخصصی ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،

تهران، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات مادر، جنین و نوزاد، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران،

ایران

۳- بخش ژنتیک، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم

پزشکی تهران، تهران، ایران

Rajaei A¹, Rashidi-Nezhad A^{*2,3}, Alebouyeh M⁴, Shirkoohi R^{3,5}

1-McS Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Maternal, Fetal and Neonatal Research Center, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Genetic Ward, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Pediatric infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Associate Professor, Molecular Genetic Department, Cancer Research Center, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arashidinezhad@tums.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

گاستریت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های درگیرکننده معده انسان می‌باشد. این بیماری در اغلب موارد هیچ نشانه‌ای از خود نشان نمی‌دهد و اگر تحت درمان قرار نگیرد می‌تواند سبب پاسخ التهابی مزمن، متاپلازی روده‌ای، آتروفی، و سرطان در بافت معده شود. شکسته شدن دو رشته DNA و فعال‌سازی مسیرهای ترمیم DNA مستعد خطا در پی گاستریت ناشی از باکتری *Helicobacter pylori* می‌تواند منجر به تجمع جهش‌ها و بی‌ثباتی ژنومی شود که ممکن است باعث بروز سرطان معده شود. به‌منظور تایید این فرضیه بیان ژن‌های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* که در توقف چرخه سلولی و ترمیم شکست‌های دورشته‌ای نقش دارند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. ۱۸۰ نمونه بیوپسی بافت معده از مراجعه‌کنندگان برای انجام آندوسکوپی تهیه شد. از این تعداد، ۶۰ نمونه که دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند انتخاب شدند و به ۲ گروه مورد (گاستریت مزمن متوسط با آلودگی *H. pylori*) و شاهد (گاستریت مزمن خفیف بدون آلودگی *H. pylori*) تقسیم‌بندی شدند. استخراج RNA این نمونه‌ها صورت گرفت و پس از سنتز cDNA، در نهایت توسط روش Real Time PCR میزان سطوح تغییرات بیان ژن‌های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* در گروه مورد در مقایسه با شاهد سنجیده شد. ژن‌های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* در گروه مورد نسبت به شاهد به ترتیب ۸/۵ برابر ($SD \pm 8/16$)، ۷/۶ برابر ($SD \pm 13/09$)، و ۴/۳ برابر ($SD \pm 12/7$) افزایش سطح بیان داشتند. افزایش سطوح تغییرات بیان ژن‌های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* در بافت معده گروه مورد نسبت به شاهد ممکن است نشان‌دهنده فعال شدن ژن‌های مسیر نو ترکیبی غیر هومولوگ در اثر عفونت *H. pylori* باشد.

واژه‌های کلیدی

شکست‌های دو رشته‌ای

گاستریت

مسیرهای ترمیم مستعد خطا

CHEK2

DCLRE1C

Helicobacter pylori

XRCC4

باکتری *Helicobacter pylori* در سال ۱۹۹۴ توسط سازمان بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) در سازمان بهداشت جهانی (WHO) به عنوان یک عامل سرطان زای گروه ۱ معرفی شده است (IARC 1994). تاکنون به دنبال مطالعات اپیدمیولوژیک و میکروب شناسی سلولی انواع مختلفی از عوامل بیماری زایی در این باکتری، از جمله انکوپروتئین CagA و سیتوتوکسین VacA، و همچنین تحریر سیستم ایمنی منتج از میانکشی این عوامل با میزبان، به عنوان دلایل بروز سرطان در مبتلایان معرفی شده است. این میانکشی ها می توانند سبب براه افتادن آبشار سیتوکینی در بافت معده و به دنبال آن جلب و تمایز سلول های ایمنی سیستمیک و موضعی شده، که خود منجر به رخداد های ژنتیکی ثانویه غیر قابل بازگشت در این عضو می شود.

سرطان معده سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان ها در جهان می باشد (Ge et al. 2018). از آنجا که نشانگر های زیستی سرطان معده، به اندازه کافی حساس و اختصاصی برای تشخیص این بیماری نیستند، از روش آندوسکوپی تحت عنوان یک روش تهاجمی معمول، در تشخیص سرطان معده استفاده می شود (Yoo et al. 2017). گاستریت مزمن، دیگر بیماری درگیر کننده معده، به عنوان یک بیماری التهابی چند مرحله ای، پیش رونده و طولانی مدت مشخص می شود (Sipponen and Maaroos 2015). مطالعات نشان داده اند که بین سرطان معده و گاستریت، ارتباط وجود دارد (Rugge et al. 2019). در مورد مکانیسم مولکولی سرطان معده اسناد متعددی وجود دارد که بر نقش ژن های بی شمار در شروع و پیشرفت این بیماری تأکید دارند (Zali et al. 2011). ژنتیک گاستریت مزمن به ویژه نوع مرتبط آن با *H. pylori* نشان داد که ژن های مختلف در رشد این بیماری، نقش دارند (Moss et al. 1994).

لقای پلی مورفیسم ها، شکست های تک رشته ای و دو رشته ای در DNA سلول های بافت معده از جمله رخداد های ژنتیکی شناخته شده مبتلایان به سرطان معده می باشد (Cover And Blaser 1992) که فعال سازی مسیر های ترمیم را از طریق (HR) Homologous Recombination و Non-Homologous (NHEJ) End Joining به دنبال دارند (Takata et al. 1998). مسیر ترمیمی

NHEJ بیشتر مستعد خطا می باشد، زیرا از هیچ گونه الگوی مکمل DNA جهت ترمیم مناطق آسیب دیده استفاده نمی کند و این امر می تواند سبب بروز ناپایداری ژنومی پس از ترمیم (DSB Double strand break) شود (Lieber et al. 2010). مطالعات نشان داده اند که آسیب DNA می تواند سبب توقف چرخه سلولی شود تا سلول فرصت لازم جهت ترمیم آسیب DNA و اطمینان از صحت DNA جهت انتقال به نسل های بعدی سلول به دست آید (Hanada et al. 2014). NHEJ می تواند ریسک ابتلا به سرطان در بیماران را به واسطه تجمع موتاسیون های حذف شدگی و اضافه شدگی افزایش دهد (Mao et al. 2008). از آنجا که اطلاعات کمی در رابطه با نقش عفونت *H. pylori* و شکستگی DSB و القای مکانیسم ترمیم NHEJ در مبتلایان وجود دارد، در این مطالعه به منظور بررسی احتمال دخالت *H. pylori* در ایجاد آسیب DNA در مراحل اولیه گاستریت معده، به سنجش بیان ژن های پرداخته شد که در توقف چرخه سلولی (CHEK2) و نیز فعال سازی مسیر NHEJ نقش ایفا می کنند.

مواد و روش ها

روش و چگونگی نمونه گیری جهت بررسی آندوسکوپی و هیستوپاتولوژیک ضایعات معده در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه و پس از تأیید مفاد آن در کمیته اخلاق پزشکی، به اجرا گذاشته شد. با هماهنگی صورت گرفته با واحد آندوسکوپی بیمارستان فیروزگر تهران، تعداد ۱۸۰ نمونه بیوپسی از بافت معده بیماران مبتلا به ضایعات مختلف هیستوپاتولوژیک در بازه زمانی ۶ ماه اول سال ۱۳۹۸، تهیه شد و در تمامی موارد از افراد شرکت کننده در مطالعه، رضایت نامه تهیه شد. در نهایت نمونه هایی که دارای معیار های ورود به مطالعه یعنی دارای گاستریت مزمن خفیف یا متوسط و آلودگی یا عدم آلودگی با باکتری *H. pylori* بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. معیار های خروج از مطالعه شامل: افراد دارای گاستریت حاد، افراد دارای سرطان معده در سطوح مختلف، بیماران دارای سابقه جراحی های دستگاه گوارش، بیماران مصرف کننده آنتی بیوتیک در سه هفته

گذشته، و افراد دارای متاپلازی روده‌ای، نئوپلازی و دیسپلازی است.

بررسی هیستوپاتولوژیک بیوپسی‌های تهیه شده، توسط واحد پاتولوژی بیمارستان فیروزگر تهران (شش ماه اول سال ۱۳۹۸) صورت گرفت. شاخص‌های تشخیصی جهت ارزیابی گاستریت بر اساس Updated Sydney classification of Gastritis طبقه‌بندی شد (Dixon et al. 1996). همچنین بررسی کشت میکروبی نمونه‌های تهیه شده در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت گرفت.

برای استخراج RNA از نمونه‌های بیوپسی، از کیت استخراج RNA شرکت پارس توس (به شماره کاتالوگ A101231) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه طیف سنج نانودراپ ۱۰۰۰ تعیین شد. RNA استخراج شده بلافاصله برای انجام مرحله نسخه‌برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت شرکت پارس توس (به شماره کاتالوگ A101161) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور همسان‌سازی غلظت cDNAهای تولید شده، قبل از انجام واکنش تولید cDNA رقیق‌سازی RNAها توسط آب مقطر فاقد DNase و

RNase به غلظت تقریبی ۲۵۰ ng/μl صورت گرفت و غلظت نهایی توسط نانودراپ تأیید شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژنهای *CHEK2*، *DCLRE1C*، *XRCC4* و *B2M* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (نسخه ۴،۱،۰) انجام شد. سپس با استفاده از ابزارهای قدرتمند Blast و Oligo Analyzer از یکتا بودن محل جفت آغازگرها و ساختمان فضایی آن‌ها اطمینان حاصل شد. ساخت و تولید آغازگرها توسط شرکت متابیون آلمان صورت گرفت (جدول ۱). در خلال این مطالعه ژن *B2M* به‌عنوان ژن کنترل یا Housekeeping gene انتخاب شد.

برای اندازه‌گیری برای ژن‌ها از واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به‌صورت نسبی صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real Time PCR به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسانس در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین با استفاده از دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در لحظه (Qiagen, Rotorgene 5-plex) محصول سال ۲۰۱۶ در کشور آلمان) انجام گرفت. اجزای واکنش PCR Real Time در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژنهای *CHEK2*، *B2M*، *DCLRE1C* و *XRCC4*

توالی پرایمر	Tm(°C)	طول محصول هدف (bp)
B2M-Forward: AGATGTCTCGCTCCGTGG	۸/۵۸	۸۵
B2M-Reverse: TGAATCTTTGGAGTACGCTGG	۰۳/۵۸	
CHEK2-Forward: TTTGCCAATCTTGAATGTGTGAATG	۳/۵۹	
CHEK2-Reverse: GCCACTGTGATCTTCTATGTATGC	۵۵/۵۹	۱۸۹
DCLRE1C-Forward: CAACAGACCGCAACACTCAGA	۸۱/۶۰	۱۹۸
DCLRE1C-Reverse: ATGAACCTCTCTCCAGTCCTCACA	۵/۶۰	
XRCC4-Forward: AGGCTTCTGAGAGATTGGAATGATG	۶۹/۶۰	
XRCC4-Reverse: GCAGTTTCCCCTTCTTGTTTGATG	۸/۶۰	۲۰۰

جدول ۲- اجزای واکنش استاندارد Real Time PCR

اجزای واکنش	حجم مصرفی اجزای واکنش
SYBR Green Master Mix 2X(BioFACT)	۵ µL
cDNA (250 ng/µl)	۱ µL
Forward and Reverse primer (5 pmol/µL)	۱ µL
ddH ₂ O	۳ µL
حجم نهایی واکنش ۱۰ µL	

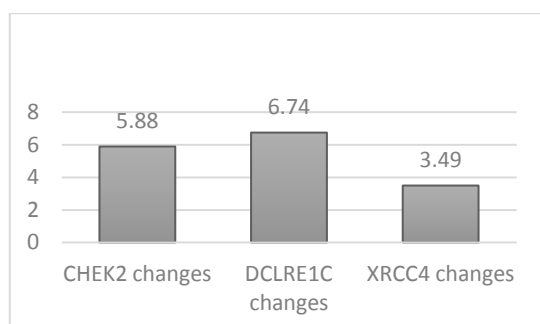
Real-time PCR با استفاده از روش *XRCC4* و *DLCRE1C* سنجیده شد. نتایج به دست آمده حاکی از این امر بودند ژن های *CHEK2*، *DLCRE1C* و *XRCC4* به ترتیب ۸۸/۵، ۷۴/۶ و ۴۹/۳ برابر افزایش بیان در گروه مورد نسبت به شاهد نشان دادند (نمودار ۱، جدول شماره ۵).

جدول ۳- برنامه حرارتی تکثیر ژن های *DLCRE1C*، *CHEK2*، *B2M* و *XRCC4*

دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
۹۵	۱۵ دقیقه	۱
۹۵	۱۰ ثانیه	۴۰
۶۲	۵ ثانیه	
۵۸	۵ ثانیه	
۵۵	۵ ثانیه	
۷۲	۱۵ ثانیه	

جدول ۴- توزیع فراوانی جنسیت در گروه های مورد و شاهد.

جنسیت	مورد (%)	شاهد (%)	مجموع (%)
مذکر	۱۶ (۲۶/۷٪)	۱۱ (۱۸/۳٪)	۲۷ (۴۵/۸٪)
مونث	۱۴ (۲۳/۳٪)	۱۹ (۳۱/۷٪)	۳۳ (۵۵/۲٪)
مجموع	۳۰ (۵۰/۰٪)	۳۰ (۵۰/۰٪)	۶۰ (۱۰۰٪)



نمودار ۱- میانگین تغییرات بیان ژن های *CHEK2*، *DLCRE1C* و *XRCC4* در گروه افراد مورد نسبت به شاهد

همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر ۴ ژن با استفاده از روش Real Time PCR یکسان و طبق جدول ۳ بود. رسم منحنی ذوب به وسیله اندازه گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمان های مختلف توسط دستگاه Real Time PCR صورت گرفت. در تمامی مراحل Real Time PCR از یک نمونه کنترل منفی جهت اطمینان از عدم آلودگی Master Mix واکنش، استفاده شد. کنترل منفی از آب، پرایمرها و Master Mix تهیه شده است و به عنوان یک نمونه همانند نمونه های دیگر در واکنش PCR قرار گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Relative Quantitative Real Time PCR داده های خام به صورت Ct (Cycle Threshold) از دستگاه استخراج شد و در نرم افزار Microsoft Excel 2016 شد و توسط فرمول $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ تغییرات بیان ژن ها محاسبه شد. تمام تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS (Statistical package for the social science نسخه ۲۳) انجام شد. تست Chi-square جهت بررسی ارتباط بین متغیرهای کیفی استفاده شد. همچنین برای مقایسه اطلاعات کمی و کیفی از تست Independent-Samples T test استفاده شد. تفاوت ها در صورتی معنی دار در نظر گرفته شدند که $p \leq 0.05$ باشد. آنالیز داده ها به صورت بدون نام انجام گرفت و اطلاعات حاصل از آن به صورت محرمانه در اختیار مسئول پژوهش قرار گرفت. از مجموع ۱۸۰ فرد مراجعه کننده، در نهایت ۶۰ نفر به عنوان جامعه آماری مورد مطالعه در این پژوهش که دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند، در نظر گرفته شدند. بر این اساس ۳۰ نفر دارای گاستریت مزمن خفیف بدون عفونت هلیکوباکتر پیلوری به عنوان گروه شاهد و ۳۰ نفر دارای گاستریت مزمن متوسط با حضور عفونت هلیکوباکتر پیلوری تحت عنوان گروه مورد طبقه بندی شدند. اطلاعات مربوط به توزیع فراوانی جنسیت بیماران در جدول ۴ نمایش داده شده است. تغییرات بیان ژن های *CHEK2*.

جدول ۵- میانگین تغییرات بیان ژن های CHEK2, DCLRE1C و XRCC4 در گروه افراد مورد نسبت به شاهد

انحراف معیار	میانگین نسبی تغییرات	بیشینه	کمینه	تعداد	تغییرات بیان ژن
*(SD)	*(RQ)				
۸۶۵/۸	۵/۸۸۷	۵۰/۴۴	۱۰/۰	۳۰	CHEK2
۰۹۸/۱۳	۷۴۱/۶	۱۰/۵۸	۰/۰	۳۰	DCLRE1C
۱۲۰/۷	۴۹۳/۳	۷۰/۳۰	۰/۰	۳۰	XRCC4

* RQ; Relative quantification, * SD; Standard deviation

بحث

در حال حاضر، *H.pylori* به عنوان یک عامل اتیولوژیک متداول در سرطان های مرتبط با عفونت در نظر گرفته می شود، که سهم نسبتاً زیادی از سرطان را در سراسر جهان شامل می شود. شیوع *H.pylori* بسته به وضعیت اقتصادی- اجتماعی، تحصیلات، سطح زندگی و شغل متفاوت است. میزان عفونت هلیکوباکتریلوری در کشورهای در حال توسعه بالاتر از کشورهای پیشرفته و صنعتی گزارش شده است. میزان عفونت هلیکوباکتریلوری در استان های مختلف ایران ۳۶ تا ۹۰ درصد گزارش شده است.

عفونت *H.pylori* بزرگ ترین عامل خطر برای گاستریت و بیماری زخم معده است و گزارش شده است که ارتباط نزدیکی با بروز سرطان معده دارد. اگرچه بیشتر مبتلایان به *H.pylori* در طول زندگی بدون علامت هستند، انتظار می رود اکثریت به سمت التهاب مزمن پیشرفت کنند.

التهاب مزمن به عنوان یکی از عوامل خطر در بسیاری از انواع سرطان ها در نظر گرفته شده است. التهاب مزمن ناشی از عفونت *H.pylori* در مخاط معده به عنوان مرحله شروع در ایجاد سرطان معده در نظر گرفته می شود.

تحریک مزمن اپی تلیوم معده توسط آنتی ژن های *H.pylori* و همچنین سموم و سایر ترشحات در ارتباط با جذب سلول های سیستم ایمنی به مخاط معده (سایتوکین ها)، همه با هم، یک محیط ریز فعال شده را به نفع شروع زخم های بدخیم فراهم می کنند. درک پاسخ ایمنولوژیک به گاستریت ناشی از *H.pylori* و در نتیجه سرطان زایی، راهی روشن به سمت استراتژی های جدید علیه این عفونت مهم را فراهم می کند (Shamsdin et al. 2019). قبل از اینکه سرطان از نظر بالینی آشکار شود، یک فرآیند پیش سرطانی طولانی مدت انجام می شود، با مراحل متوالی کاملاً

مشخص: گاستریت فعال مزمن، گاستریت آتروفیک مزمن، متاپلازی روده ای (ابتدا نوع روده ای کامل یا کوچک) و سپس دیسپلازی (که به آن نئوپلازی داخل اپی تلیال نیز گفته می شود) و سرانجام سرطان تهاجمی. این فرآیند با عفونت با *H.pylori* آغاز و پایدار می ماند. اگرچه که کلنی های باکتری در محیط معده باقی می ماند، اما فرآیند التهابی را در مخاط معده القا می کنند که معمولاً ده ها سال به طول می انجامد و ممکن است منجر به از بین رفتن غدد معده (آتروفی) شود (Correa 2013).

با توجه به این که سرطان معده هنوز به عنوان یک بیماری مرگبار شناخته می شود، شناسایی نشانگرهای مولکولی، ژنتیکی و تغییرات اپی ژنتیکی و ویژگی های فارماکوژنتیک جدید ممکن است وضعیت تشخیص و درمان بیماران را بهبود بخشد و امیدهایی در زمینه توسعه روش های تشخیصی و درمانی مؤثرتر ایجاد نماید و همچنین باعث افزایش آگاهی در زمینه ایجاد نحوه گسترش سرطان معده شود. در سال های اخیر ارتباط بین RNA و ژن های هدف آن ها در سرطان معده مورد توجه قرار گرفته است (Effatpanah et al. 2015) و از آنجایی که تحقیق بر روی نشانگرهای نوع RNA با پیشرفت در تکنیک های PCR به ویژه Real Time PCR گسترده شده است، می توان به سراغ روش های تشخیصی زودرس رفت، تا بتوان شانس بهبودی بیماران را افزایش و هزینه های تشخیص و درمانی آن ها را کاهش داد (Zabaleta 2012).

بر اساس اطلاعات حاصل از مطالعات صورت گرفته بر روی حضور آلودگی ناشی از باکتری *H. pylori* در بافت معده و نقش احتمالی آن در ایجاد سرطان معده، در این مطالعه تصمیم بر این شد تا فازهای پیش سرطانی (گاستریت های مزمن خفیف و

باکتری *H. pylori* می باشد. همچنین ممکن است نشان دهنده که این باکتری با ایجاد شکست های دو رشته ای توانسته است توقف چرخه سلولی را القاء کند و مسیرهای ترمیم DNA مستعد خطا را فعال سازد.

با توجه به اطلاعات نویسندگان در تحقیق حاضر، مطالعات دیگری در رابطه با عفونت *H. pylori* که به بررسی بیان ژن های مسیر NHEJ بر روی بافت معده پرداخته باشد، صورت نگرفته است. تغییرات بیان ژن های درگیر در ترمیم شکست های دو رشته ای (مانند بیان ژن *CHEK2*) به واسطه *H. Pylori* تنها در یک مطالعه توسط Koeppel et al. (2015) در رده سلولی Human gastric primary cell مورد گزارش قرار داده شده است که نتایج آن با توجه به آنکه در رده سلولی و شرایط *in vitro* انجام گرفته است، قابل مقایسه با نتایج مطالعه حاضر نیست (Koeppel et al. 2015).

در مطالعه ای که توسط Bae et al. (2013) بر روی بافت معده مدل های حیوانی صورت گرفت تا اثر باکتری *H. pylori* بر بیان ژن *CHEK2* بررسی شود، نشان داده شد که بیان این ژن افزایش پیدا کرده است که در توافق با نتایج پژوهش ما می باشد. این محققان اشاره کردند که بیان ژن *TP53* نیز در کنار ژن *CHEK2* افزایش پیدا کرده است که می تواند نشان دهنده این باشد که سلول پس از توقف چرخه سلولی به علت بروز DSB، به سمت مرگ سلولی هدایت می شود (Bae et al. 2013). بر اساس این نتایج می توان نتیجه گرفت که باکتری *H. pylori* ممکن است سبب بروز شکست های دو رشته ای در DNA سلول های معده مدل های حیوانی شود و توقف چرخه سلولی را القاء کند. گزارشات از بیان ژن های *DCLRE1C* و *XRCC4* بر روی بافت معده در دسترس نیست.

عدم امکان انجام آزمایش بر روی افراد سالم به منظور دستیابی به سطوح بیانی پایه ژن های هدف و مقایسه آن با بیماران، عدم امکان بررسی سطوح تغییرات بیانی تمامی ژن ها و تنظیم گره های مسیر NHEJ، عدم تعیین میزان شکستگی DNA در سطح کروموزوم و شافلینگ ها و ترانسلوکیشن های احتمالی، و در نهایت عدم امکان بررسی ژنوم سویه های باکتریایی موجود در نمونه های بیماران و

متوسط) را از نظر بروز DSB با بررسی بیان ژن های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* بررسی کنیم.

ژن *CHEK2* که به عنوان یک ژن سرکوب گر سرطان (Tumor suppressor gene) تلقی می شود، در نمونه های مورد نسبت به شاهد به طور میانگین تا ۸/۵ برابر افزایش بیان داشته است. این افزایش بیان می تواند نشان دهنده این موضوع باشد که در گروه مورد نسبت به شاهد، توقف چرخه سلول افزایش پیدا کرده است. این امر می تواند به علت آسیب های DNA القاء شده توسط باکتری *H. pylori* باشد. بنابراین سلول با ایجاد توقف در چرخه سلولی، از انتقال ماده وراثتی معیوب به نسل بعد ممانعت می کند. بر اساس اطلاعات موجود، در زمان شکستگی DNA سیکل سلولی متوقف و سلول به سمت آپوپتوزیس یا ترمیم می رود. در توافق با این نتیجه، مطالعه ای مشابهی که توسط Hanada et al. (2014) انجام شد، گزارش شد که عفونت بافت معده توسط *H. pylori* سبب افزایش بیان ژن *CHEK2* می شود. این امر می تواند زمان لازم جهت ترمیم شکست دو رشته DNA را توسط مسیرهای ترمیم NHEJ و HR فراهم نماید. از طرف دیگر بیان ژن *DCLRE1C* که محصول آن پروتئین (ARTEMIS) به عنوان یکی از پروتئین های اصلی مسیر ترمیم NHEJ می باشد، تا ۷/۶ برابر افزایش پیدا کرده است و می تواند نشان دهنده این امر باشد که مسیر NHEJ در گروه مورد نسبت به گروه شاهد فعالیت بیشتری کسب کرده و در صدد ترمیم آسیب های احتمالی وارد شده بر DNA، بر آمده است.

ژن *XRCC4* در مراحل آخر مسیر NHEJ ایفای نقش می کند (Dueva and Iliakis 2013). بیان این ژن در گروه مورد نسبت به گروه شاهد تا ۴/۳ برابر افزایش پیدا کرده است. *XRCC4* نسبت به *DCLRE1C* افزایش بیان کمتری از خود نشان داده است که این امر می تواند به علت نیاز کمتر سلول به پروتئین این ژن نسبت به ژن *DCLRE1C* باشد.

با توجه به نقش ژن های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* در توقف چرخه سلولی و ترمیم DSB افزایش بیان این ژن ها در بیماران مبتلا به گاستریت مزمن متوسط با آلودگی *H. pylori* در مقایسه با بیماران گاستریت مزمن خفیف بدون آلودگی با *H. pylori* نشانگر فعال شدن ژن های این مسیرها به دنبال عفونت با

سپاسگزاری

از بیمارانی که در این طرح شرکت نمودند، همچنین از جناب آقای دکتر هاشم فخریاسری و سایر پزشکان و کادر درمانی بیمارستان فیروزگر تهران که در جمع‌آوری نمونه‌ها ما را باری نمودند کمال تشکر را داریم. از زحمات جناب آقای دکتر عباس شکوری رئیس بخش ژنتیک بیمارستان امام خمینی (ره)، جناب آقای دکتر مجتبی صفاری و سرکار خانم دکتر زهره میرباقری به‌خاطر کمک‌های بی دریغ در انجام مراحل آزمایشگاهی، کمال تشکر را داریم.

این مطالعه برگرفته از پایان مقطع فوق لیسانس دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات است که در آزمایشگاه تحقیقاتی بخش ژنتیک مجتمع بیمارستان امام خمینی (ره) دانشگاه علوم پزشکی تهران، با همکاری علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در خلال سال ۱۳۹۸ به اجرا رسیده است.

منابع

- Bae M, Lim JW, Kim H (2013) Oxidative DNA Damage Response in *Helicobacter pylori*-Infected Mongolian Gerbils. *Journal of cancer prevention* 18: 271-275.
- Correa P (2013) Gastric cancer: overview. *Gastroenterology clinics of North America* 42: 211-217.
- Cover TL, Blaser MJ (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry* 267: 10570-10575.
- Dueva R, Iliakis G (2013) Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research* 2:163-177.
- Effatpanah H, Yadegarazari R, Karami M, Majlesi A, Shabab N, Saidijam M (2015) Expression Analysis of mir-21 and mir-221 in Cancerous Tissues from Iranian Patients with Gastric Cancer 19: 188-193.
- Ge, Sai, Xia Xia, Chen Ding, Bei Zhen, Quan Zhou, Jinwen Feng, Jiajia Yuan, Rui Chen, Yumei Li, Zhongqi Ge, Jiafu Ji, Lianhai Zhang, Jiayuan Wang, Zhongwu Li, Yumei Lai, Ying Hu, Yanyan Li, Yilin Li, Jing Gao, Lin Chen, Jianming Xu, Chunchao Zhang, Sung Yun Jung, Jong Min Choi, Antrix Jain, Mingwei Liu, Lei Song, Wanlin Liu, Gaigai Guo, Tongqing Gong, Yin Huang, Yang Qiu, Wenwen Huang, Tielu Shi, Weimin Zhu, Yi Wang, Fuchu He, Lin Shen, and Jun Qin (2018) "A Proteomic Landscape of Diffuse-Type Gastric Cancer." *Nature Communications*.

درک ارتباط آن‌ها با میزان فعال شدن مسیر NHEJ از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشند.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این مطالعه افزایش بیان ژنهای CHEK2، DCLRE1C و XRCC4 را در بیماران مبتلا به گاستریت مزمن متوسط با آلودگی *H. pylori* در مقایسه با بیماران گاستریت مزمن خفیف بدون آلودگی با *H. pylori* نشان داد که نشانگر فعال شدن ژنهای مسیرهای ترمیمی و توقف چرخه سلولی به دنبال عفونت با باکتری *H. pylori* باشد. با توجه به نتایج این مطالعه و در صورت اثبات نقش این ژن‌ها در ایجاد سرطان معده در مطالعات آینده ممکن است بتوان از بررسی بیان ژنهای مذکور به‌طور بالقوه به‌عنوان نشانگر زیستی برای تشخیص زودهنگام ابتلا به سرطان معده به‌کار رود و زمینه ساز درمان مناسب باشد.

- Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y, Watada M, Yamaguchi N, Yamamoto K, Shiota S, Moriyama M, Graham DY, Yamaoka Y (2014) *Helicobacter pylori* infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. *Infection and immunity* 82: 4182-4189.
- IARC (1994) Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Iarc Monogr Eval Carcinog Risks To Humans.
- Koeppel, Max, Fernando Garcia-Alcalde, Frithjof Glowinski, Philipp Schlaermann, and Thomas F. Meyer. 2015. "Helicobacter Pylori Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells." *Cell Reports* 11: 1703-13.
- Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG (2010) Nonhomologous DNA End Joining (NHEJ) and Chromosomal Translocations in Humans. In: Nasheuer HP. (eds) *Genome Stability and Human Diseases. Subcellular Biochemistry*, vol 50. Springer, Dordrecht.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA repair* 7: 1765-1771.
- Moss SF, Legon S, Davies J, Calam J (1994) Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. *Gut* 35: 1567-1570.
- Rezaei-Tavirani M, Rezaei-Tavirani M, Mansouri V, Mahdavi SM, Valizadeh R, Rostami-Nejad M, Zali MR (2017) Introducing crucial protein panel of gastric adenocarcinoma disease. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 10: 21-28.

Rugge M, Meggio A, Pravadelli C, Barbareschi M, Fassan, M, Gentilini M, Zorzi M, Pretis G, Graham DY, Genta RM (2019) Gastritis staging in the endoscopic follow-up for the secondary prevention of gastric cancer: a 5-year prospective study of 1755 patients. *Gut* 68: 11-17.

Shamsdin SA, Alborzi A, Lankrani KB, Ghaderi A, Pouladfar GR. Significance of TC9 and TH9 in *Helicobacter pylori*-induced gastritis (2020) *Helicobacter*. 25: e12672.

Sipponen P, Maaroos HI (2015) Chronic gastritis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 50: 657-667.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal

integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* 17: 5497-5508.

Yoo MW, Park J, Han HS, Yun YM, Kang JW, Choi DY, Lee JW, Jung JH, Lee KY, Kim KP (2017) Discovery of gastric cancer specific biomarkers by the application of serum proteomics. *Proteomics* 17: 10.

Zabaleta J (2012) Multifactorial etiology of gastric cancer. *Methods in molecular biology* 863: 411-435.

Zali H, Rezaei-Tavirani M, Azodi M (2011) Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 4: 175-185.