

بررسی بیان پروتئین سیکلواکسیژناز-۲ در سرطان معده القایی به وسیله هلیکوباکتر پیلوری در موش صحرایی

فاطمه آئینی^۱، محمدجعفر رضایی^۲، رشید رمضانزاده^۳، آرش پولادی^۴، بهرام نیکخو^۵

^۱ دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، زنجان، ایران.

^۲ استادیار آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

^۳ استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

^۴ دانشجوی دکتری ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۵ استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان معده یکی از مهم ترین سرطان های رایج معده- روده ای است که میزان مرگ و میر ناشی از آن در جهان رو به افزایش است. هلیکوباکتر پیلوری (*H. Pylori*)، عامل اصلی گاستریت و زخم معده می باشد. سیکلواکسیژناز (COX) آنزیم اصلی در بیوسنتز مسیر پروستاگلندین ها به شمار می رود. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که در سرطان کولون و دیگر سرطان ها میزان COX-2 بیش از حد بیان می شود. به منظور تأیید این یافته ها در سرطان معده، در این تحقیق یافته های ایمونوهیستوشیمیایی مخاط معده در یک الگوی حیوانی سرطان معده القا شده توسط هلیکوباکتر پیلوری در موش صحرایی (Sprague Dawley) بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه موش ها در سه گروه ۵ تایی به طور تصادفی تقسیم شدند. موش های صحرایی گروه ۱ به عنوان گروه کنترل (گروهی که MNU و هلیکوباکتر پیلوری دریافت نکردند)، انتخاب شدند. موش های صحرایی گروه ۲، MNU را دریافت کردند. در موش های صحرایی گروه ۳ نیز همین دستورالعمل رعایت شد و یک هفته بعد، سه دفعه در روز و به صورت یک روز در میان، هلیکوباکتر پیلوری گاوژ گردید. موش های گروه های کنترل، آزمایش ۱ و ۲ در طی دوره آزمایش به صورت استاندارد تغذیه شدند. بعد از گذشت ۲۰ هفته موش ها تحت شرایط بیهوشی وزن شدند و از نصف بافت معده نمونه گیری انجام شد. نمونه های معده به ۶ قطعه کوچکتر تقسیم شدند، سپس در فرمالین ۱۰٪ فیکس و به روش استاندارد آماده شده و در پارافین قالب گیری شدند. در ادامه، برش های ۶ میکرومتری از آنها تهیه و توسط رنگ آمیزی H&E بررسی گردید. آزمایشات ایمونوهیستوشیمیایی توسط رنگ آمیزی COX-2 نیز صورت گرفت. برای تأیید عفونت هلیکوباکتر پیلوری ۳ mm از مخاط معده به محیط بروسلا آگار انتقال داده شد. سپس کلنی های اثر یافته پس از مدت ۳-۵ روز توسط رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز و مورفولوژی بررسی شدند. همچنین ۳ mm از نمونه معده توسط کیت سریع اوره بررسی گردید.

یافته ها: در این مطالعه، وزن حیوانات گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافت. مطالعات هیستوپاتولوژی در گروه آزمایش ۱ و ۲ نشان داد که اینفیلتریشن شدید سلول های پلی مورفونوکلر و مونونوکلر در لایه لامینا پروپریا و زیر مخاط آنتروم، تکثیر سلول های اپی تلیوم معده، همچنین اینفیلتراسیون ازوفازیا ل روی داده است. همچنین در گروه کنترل تغییرات غیرطبیعی مشاهده نشد. در مطالعات ایمونوهیستوشیمی، پروتئین COX-2 در معده گروه های آزمایش مشاهده گردید، اما در گروه کنترل دیده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد هلیکوباکتر پیلوری باعث کاهش معنی داری در وزن حیوانات شده است. همچنین مطالعات هیستوپاتولوژی، متاپلازی ازوفازیا ل در معده موش های صحرایی را نشان داد. در مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نیز مشخص گردید که پروتئین در طی مراحل اولیه متاپلازی بیان می گردد.

کلید واژه ها: سرطان معده؛ هلیکوباکتر پیلوری؛ سیکلواکسیژناز-۲.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: rezaiejm@hotmail.com

تلفن: ۰۸۷۱-۶۶۶۴۶۵۲

تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۲

مقدمه

سرطان معده دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان بوده و معمولاً پیش آگهی بدی دارد (۱). بروز آن در برخی کشورها همچون آمریکا و انگلیس کاهش یافته است (۲)، اما همچنان در بسیاری از کشورها مانند ژاپن، چین، ایتالیا و کشورهای در حال توسعه در حد بالایی قرار دارد (۳). در کشورهای توسعه یافته عفونت هلیکوباکتر پیلوری در کمتر از ۵۰٪ جمعیت بالغ و در کشورهای در حال توسعه مانند ایران میزان این عفونت بالاتر است و نزدیک به ۸۰٪ جمعیت بالغ را در بر می گیرد (۴). هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله ای شکل و میکروآئروفیل است که اغلب در دوران کودکی معده را آلوده می کند و برای مدت طولانی در آن باقی می ماند، همچنین هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک پاتوژن گوارشی، موجب التهاب مزمن و فعال معده و نیز زخم های گوارشی در انسان می شود (۵، ۶). هلیکوباکتر پیلوری شایع ترین علت ایجاد زخم های پپتیک و گاستریت محسوب می شود؛ به طوری که ۹۰-۶۰٪ بیماران با زخم دوازده و ۷۰٪ بیماران با زخم معده مبتلا به هلیکوباکتر هستند، این باکتری در لنفوم و آدنوکارسینوم معده نیز نقش دارد (۸-۶). مطالعات انجام شده بر روی سرطان معده در برخی مناطق، بیانگر این مطلب است که بعضی عوامل محیطی از جمله سیگار کشیدن، غذاهای نمک دار و سابقه خانوادگی برای سرطان معده خطرزا بوده و بر اثر این عوامل و بعضی تغییرات ژنتیکی مستعدکننده، ضایعات پیش سرطانی (Precancerous) به وجود می آید و طی مراحل به سمت سرطان معده پیشرفت می کند (۹، ۸). از جمله عواملی که بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است فاکتورهای بیماری زایی باکتریال هستند که ایجاد گاستریت کرده و در نهایت منجر به سرطان معده می شوند (۱۰، ۱۱). در ۲ دهه گذشته آزمایشات کلینیکی و مطالعات اپیدمیولوژیک بسیاری در ارتباط با سرطان و حضور سیکلواکسیژنازها در سلول های سرطانی انسان انجام گرفته است. آنزیم اصلی ساخت پروستاگلاندین ها، COX است که به صورت ۲ ایزوفروم (COX-1، COX-2) وجود دارد. بروز ژن COX-2 به وسیله محرک های التهابی القا می شود (۱۳-۱۱). مطالعات نشان داده است آنزیم سیکلواکسیژناز در ایجاد سرطان های معده- روده ای نقش مهمی دارد و سطح این آنزیم در سرطان های دستگاه گوارش افزایش می یابد (۱۳-۱۱). همچنین آنزیم COX-2

به عنوان یکی از مهم ترین مدیاتورهای القاکننده سرطان، به ویژه سرطان دستگاه گوارش مطرح است (۱۱) (۱۵-۱۳). از سوی دیگر تاکنون بیشتر تحقیقات بر روی تغییرات هستیوپاتولوژی سرطان معده در درازمدت صورت گرفته است و بر روی وقایع مولکولی سرطان در کوتاه مدت، مطالعات بسیار اندکی وجود دارد. در بیشتر تحقیقات بررسی سرطان، مدت زمان در نظر گرفته شده، بیش از ۴۰ هفته از آغاز آزمایش می باشد که در این مدت پروسه سرطان کاملاً پیشروی دارد (۱۱، ۱۳). در این مطالعه، در مدت زمان ۲۰ هفته بعد از ایجاد سرطان، یکی از مسیرهای مهار سرطان که وابسته به پروتئین COX-2 است، بررسی گردید که در مورد دوره زمانی کوتاه مدت ۲۰ هفته بعد از القای سرطان گزارشی وجود نداشت، لذا انجام تحقیقات در این زمینه ضروری است. در مطالعه حاضر، یک مدل آزمایشگاهی سرطان معده ایجاد شده و بیان پروتئین COX-2 که نقش مهمی در مراحل اولیه ایجاد سرطان القایی معده دارد، بررسی شد؛ تا از نتایج این تحقیق بتوان در بحث درمان و پیشگیری سرطان معده استفاده نمود.

روش بررسی

تعداد ۱۵ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد (Sprague Dawley) ۸-۶ هفته ای در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ g در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی کردستان پرورش داده شدند، موش های صحرایی به طور تصادفی در سه گروه کنترل، آزمایش ۱ و آزمایش ۲ در قفس های کوچکی حاوی آب و مواد غذایی اتوکلاو شده، نگهداری شدند (تعداد ۵ سر در هر گروه). سویه هلیکوباکتر پیلوری از مرکز انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سویه هلیکوباکتر پیلوری مورد نظر روی پلیت های بروسلا آگار حاوی ۷-۵٪ خون گوسفندی و آنتی بیوتیک های مربوط کشت داده شد و تحت شرایط میکروآئروفیل در ۳۷°C به مدت ۷-۵ روز انکوبه گردید. سویه های جدا شده هلیکوباکتر پیلوری براساس تصویر کلنی ها، رنگ آمیزی گرم، تولید اوره آز، کاتالاز و اکسیداز شناسایی و کنترل شدند (۱۳، ۱۶). برای ایجاد مدل حیوانی سرطان معده توسط هلیکوباکتر پیلوری، از کلنی های هلیکوباکتر رشد یافته در پلیت بروسلا آگار برداشته و در محیط کشت بروسلا براث کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون ۱ ml از ۰/۱ از سوسپانسیون هلیکوباکتر پیلوری تحت ۳ دوز حاوی 1×10^9 CFU از طریق سرم گاواژ به درون معده

موش صحرایی گاوژ گردید (۱۶-۱۳). موش های صحرایی به طور تصادفی در سه گروه ۵ تایی شامل: ۱. گروه کنترل (طبیعی)، ۲. گروه آزمایش ۱: هلیکوباکتر پیلوری، ۳. گروه آزمایش ۲: MNU (N- نیتروز-N- متیل اوره) قرار داده شدند. به گروه آزمایش ۲، ماده MNU یک هفته در میان تا هفته دهم با ۲۰۰ ppm در آب آشامیدنی این گروه اضافه شد (۱۳). به موش های صحرایی گروه آزمایش ۱، هلیکوباکتر پیلوری ۳ بار در روز یک روز در میان (یک هفته بعد از دادن MNU) برای مدت ۱۲ هفته گاوژ شد (۱۴-۱۱). بعد از ۲۰ هفته از انجام آزمایش، وزن حیوانات اندازه گیری و با استفاده از اتر بیهوش شدند، سپس تحت شرایط بی حسی از معده موش های صحرایی گروه کنترل و آزمایش ۱ و ۲ برای انجام آزمایشات زیر نمونه گیری به عمل آمد.

الف) مطالعات میکروبی: برای تأیید عفونت هلیکوباکتر پیلوری، حدود ۳ mm از انحنای بزرگتر معده برداشته شد، سپس با استفاده از ۱۰ μl PBS استریل هموژنیزه گردید. بخشی از نمونه یکنواخت شده به محیط بروسلا آگار ۵٪ خون گوسفندی که محتوی وانکومایسین ۲۰ mg/ml، نالیدیکسیک اسید ۱۰ mg/ml، باکتریوسین ۳۰ mg/ml و آمفوتریسین B، ۲ mg/ml بود، منتقل گردید و روی پلیت کشت داده شد. برای ۳ تا ۵ روز در شرایط میکروآئروفیل کلنی ها رشد کردند. برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری، مورفولوژی این کلنی ها با استفاده از اسمیر، رنگ آمیزی گرم بررسی گردید. همچنین جهت تأیید بیشتر، فعالیت اوره آزی، فعالیت کاتالازی، فعالیت اکسیدازی، مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید، عدم تولید SH2 و تست اندول بررسی شد (۱۷، ۱۴، ۱۱).

ب) مطالعات بافت شناسی: برای مطالعات بافت شناسی یک برش طولی از معده در امتداد خم بزرگ معده از مری تا دوازده زده شد، سپس نمونه ها در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. نمونه ها به صورت معمول پروسس داده شدند و برش های ۶ میکرومتری جهت مطالعات هیستوشیمی تهیه گردید. اسلایدها با رنگ های هماتو کسیلین-ائوزین (H&E) و گیمسا جهت مطالعه التهاب و وجود باکتری رنگ آمیزی شدند (۱۴).

ج) مطالعات ایمونوهیستوشیمی: جهت انجام این مطالعات، نمونه ها در فرمالین فیکس و با استفاده از روش COX-2 رنگ آمیزی شدند. در این روش برش های ۶ میکرومتری بر روی اسلایدهای سیالینزه شده، منتقل شدند، سپس برش ها دی واکسه و دهیدراته شده، و با استفاده از H2O2 فعالیت پراکسیدازهای اندوژن مهار و آنتی ژن رتریوال صورت گرفت. در ادامه، اسلایدها در آنتی بادی اولیه Anti-COX-2 انکوبه شدند، سپس با استفاده از سیستم اویدین بیوتین، واکنش ایمنی کمپلکس ها مشخص گردید و رنگ آمیزی مخالف با استفاده از همتاوکسیلین مایر انجام شد (۱۶). تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون های کروسکال والیس و من ویتنی صورت گرفت و $p < 0.05$ سطح معنی داری اختلاف ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین و انحراف معیار وزن سه گروه مورد مطالعه، قبل و بعد از مداخله در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. اختلاف بین گروه ها از نظر وزن قبل از مداخله به لحاظ آماری معنی دار نبود (آزمون کروسکال والیس)، ولی بعد از مداخله اختلاف سه گروه از نظر وزن معنی دار شد ($p < 0.009$ ، آزمون کروسکال والیس). با استفاده از آزمون من ویتنی مشخص گردید اختلاف وزن گروه کنترل با گروه آزمایش اول ($p < 0.008$) و گروه کنترل با گروه آزمایش دوم ($p < 0.008$) معنی دار می باشد. اختلاف وزن گروه آزمایش اول و دوم به لحاظ آماری معنی دار نبود. میانگین تغییرات (MD) و فاصله اطمینان مقادیر وزنی (CL) به ترتیب در مقایسه گروه کنترل با گروه آزمایش ۱ (MD=100.2gr & CI=90.37 to 110.02gr) و در مقایسه گروه کنترل با گروه آزمایش ۲، (MD=106.4gr & CI=97.87 to 114.92gr) بود. براساس این نتایج می توان گفت پس از مداخله (در زمان نمونه برداری) تفاوت وزنی در دو گروه آزمایش ۱ و ۲، در مقایسه با گروه کنترل بیش از ۱۰۰ g بوده است که تفاوت مربوطه ناشی از کاهش وزن گروه های آزمایش می باشد.

جدول شماره ۱: توزیع حیوانات براساس میانگین و انحراف معیار وزن، قبل و بعد از مداخله در گروه‌های کنترل، آزمایش ۱ و ۲

گروه‌ها	وزن در شروع آزمایش	وزن در زمان نمونه‌گیری
کنترل	۲۷۲/۸±۱۳/۵۴	۳۲۷/۴±۱۳/۳۹
آزمایش ۱	۲۹۶/۴±۱۱/۱۹	۲۲۴/۲±۹/۵۷
آزمایش ۲	۲۷۰/۶±۱۱/۶۴	۲۱۸/۶±۶/۹۴

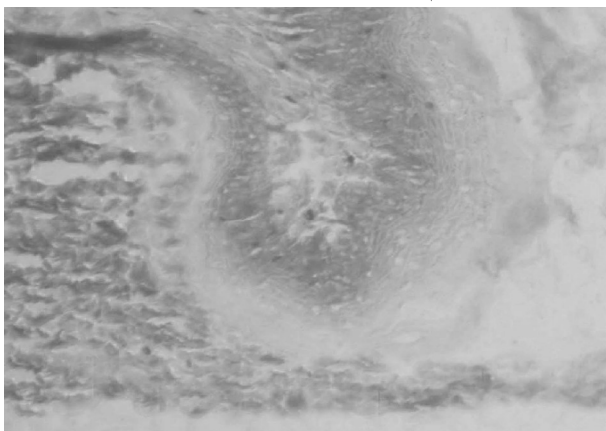
اختلاف وزن گروه‌ها قبل از آزمایش معنی‌دار نبود، ولی بعد از آزمایش بین وزن گروه کنترل با گروه آزمایش اول و دوم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (در هر دو مورد، $p < ۰/۰۰۸$). پس از ۲۰ هفته از شروع آزمایش، نمونه‌های آنتروم معده هر سه گروه به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق در کیت سریع اوره‌آز قرار گرفتند. در گروه آزمایش ۱ (گروهی که به آن هلیکوباکتر پیلوری تلقیح شده بود) کیت اوره‌آز زرد رنگ به صورتی متمایل شد (وره‌آز مثبت)، در دو گروه کنترل و آزمایش ۲ هیچ تغییری در کیت اوره‌آز مشاهده نگردید (وره‌آز منفی) (شکل شماره ۱). فعالیت اکسیدازی و کاتالازی کلنی‌های حاصل از کشت معده گروه آزمایش شماره ۱ مثبت بود، همچنین بررسی مورفولوژی باکتری‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و عدم تولید SH_2 و تست اندول منفی دلیل بر وجود هلیکوباکتر پیلوری در گروه آزمایش ۱ بود، اما در گروه کنترل و در گروه آزمایش ۲ موارد فوق‌الذکر دیده نشد.



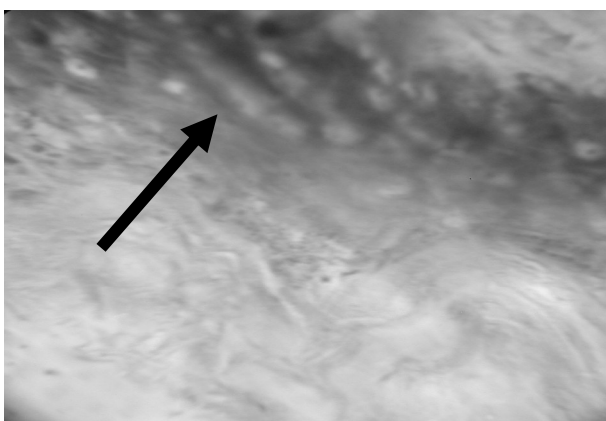
شکل شماره ۱: کیت اوره‌آز مثبت (پیکان) معده گروه آزمایشی شماره ۱ در مقایسه با کنترل نشان داده شده است.

نتایج مطالعات بافت‌شناسی نشان داد در گروه آزمایش ۱ (هلیکوباکتر پیلوری)، شواهدی از پرخونی لایه مخاطی معده، التهاب معده، تکثیر سلول‌های گلاندولار، ریزش سلول‌های اپی‌تلیومی در فضای معده، بی‌نظمی غشای پایه، تهاجم سلول‌های

غدد به‌ویژه در قسمت قاعده‌ای به لایه عضله مخاطی وجود دارد. در بررسی‌های میکروسکوپی، متاپلازیای ازوفازیاال در ناحیه کاردیا دیده شد. در گروه آزمایش ۲ (MNU) نیز تغییرات مشاهده شده مشابه با گروه آزمایشی شماره ۱ بود و آثاری از تخریب سلول‌های اپی‌تلیومی به لایه عضله مخاطی وجود داشت. سلول‌های بخش گلاندولار ویژگی سلول‌های در حال تقسیم را دارند، متاپلازیای ازوفازیاال نیز در این گروه مشاهده گردید (شکل شماره ۲ و ۳). در رنگ‌آمیزی گیمسا کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در مخاط دیده شد (شکل شماره ۳). همچنین در این بررسی ارتشاح لکوسیت‌های تک‌هسته‌ای و چند هسته‌ای و لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئر در لایه مخاطی مشاهده گردید. در موش‌های صحرایی گروه کنترل هیچ کدام از علائم فوق‌الذکر دیده نشد و اپی‌تلیوم نمای طبیعی داشت.



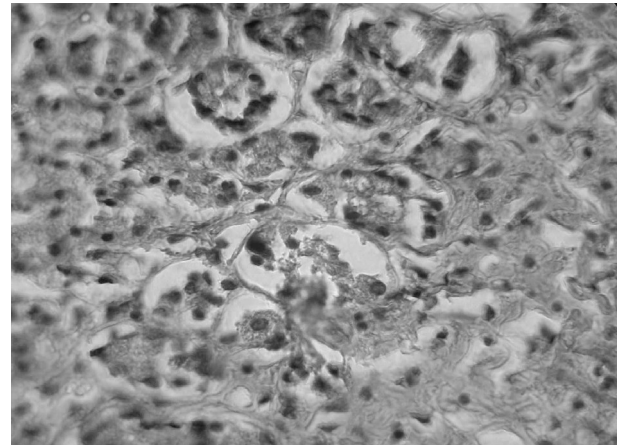
شکل شماره ۲: تصویر نمای هیستولوژیک ناحیه معده گروه آزمایشی شماره ۱ را نشان می‌دهد که در آن متاپلازیای ازوفازیاال مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی $\times 100$).



شکل شماره ۳: تصویر نمای هیستولوژیک ناحیه معده گروه آزمایشی شماره ۱ را نشان می‌دهد. متاپلازیای ازوفازیاال و کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری (توسط پیکان) در لایه سطحی مخاط نشان داده شده است (رنگ‌آمیزی گیمسا بزرگنمایی $\times 100$).

می‌باشد در بررسی‌های گذشته نیز برخی از محققین اثبات کرده‌اند که عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از عوامل مهم در بیماری‌های معده و اثنی عشر است و می‌تواند به‌عنوان یکی از فاکتورهای ایجادکننده التهاب معده و زخم‌های گوارشی و مستعدکننده سرطان معده باشد (۱۷،۹،۱). در این تحقیق حضور هلیکوباکتر پیلوری در معده و کلونیزاسیون این باکتری در گروه آزمایشی توسط کشت باکتری و کیت سریع اوره‌آز اثبات گردید. این روش به‌عنوان یک روش استاندارد توسط محققین دیگر نیز در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری پذیرفته شده است (۲۰،۱۷،۱۵،۱۱). به‌علاوه، در این مطالعه با استفاده از رنگ آمیزی گیمسا، کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در معده نشان داده شد. رنگ آمیزی گیمسا به‌عنوان یک پروتکل استاندارد در بررسی کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های هیستولوژیکی تأیید شده است (۱۳). این تکنیک ساده از آن جهت مهم است که می‌تواند به‌طور همزمان تغییرات کلونیزاسیون باکتریایی با تغییرات هیستولوژیکی معده را نشان دهد که در این بررسی با موفقیت انجام گردید. مطالعات نشان داده است سرطان به دلیل وقایع چند مرحله‌ای مولکولی-سلولی به‌وجود می‌آید (۲۱،۱۳). در بحث مهار و درمان سرطان، مهار وقایع مولکولی القاکننده سرطان قطعاً مهم‌تر از پروتکل‌های درمانی است (۲۱،۱۳). پروتئین COX-2 پروتئینی است که منجر به افزایش سنتز پروستاگلندین‌ها در ایجاد التهاب می‌شود. مطالعات نشان داده است این پروتئین یکی از عوامل اصلی در ایجاد بدخیمی و تومورهای سرطانی است (۲۳،۲۲،۲۰). اخیراً محققین نشان داده‌اند بین COX-2 و بدخیمی‌ها، ارتباط مستقیم وجود دارد و بیان سلول‌های COX-2 یکی از مهم‌ترین مسیرهای ایجاد سرطان می‌باشد (۲۵،۲۲،۲۰،۱۳). در برخی مطالعات مشخص شده است پروتئین COX-2 در سرطان کولون، ریه، معده، و مری بیان می‌شود (۱۳). در گروه‌های آزمایشی، یافته‌های این مطالعه نشان داد استفاده از MNU سبب می‌شود تا سلول‌های COX-2 در مخاط معده بیان شود، مطالعات دیگر محققین نیز بیان سلول‌های COX-2 را در مدل‌های سرطانی ایجاد شده، تأیید می‌کند (۱۷،۱۶،۱۳). مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی این تحقیق در گروه آزمایشی نشان داد با کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری، سلول‌های COX-2 بیان می‌شود، و مسیر سرطان معده القا شده توسط هلیکوباکتر پیلوری، باعث

مطالعات هیستوشیمیایی نشان داد بیان پروتئین COX-2 از زمان ۲۰ هفته بعد از القای سرطان در گروه آزمایش ۱ و گروه آزمایش ۲ قابل تشخیص است. در گروه آزمایش ۱ هلیکوباکتر پیلوری سلول‌های COX-2 هم در لایه مخاط و هم زیر مخاط لامینا پروپریا مشاهده شدند (به رنگ قهوه‌ای تیره در شکل شماره ۴) و در گروه آزمایش ۲ (MNU) نیز بیان پروتئین COX-2 در لایه مخاطی و زیر مخاطی دیده شد. تحقیق حاضر نشان داد سلول‌های COX-2 مثبت به‌ویژه در نواحی که متاپلازیای ازوفازیال روی داده است، حضور بیشتری دارند و قابل مشاهده هستند.



شکل شماره ۴: تصویر ناحیه آنتروم معده گروه آزمایشی شماره ۱ را نشان می‌دهد. متاپلازیای بافت گلاندولار معده به درون لایه‌های زیرین مشاهده می‌شود. سلول‌های COX-2 + نمای تیره‌ای دارند (رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی Anti Rat Anti COX-2 بزرگنمایی ۴۰×).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد در شروع آزمایش میانگین وزن حیوانات در سه گروه کنترل، آزمایش ۱ و آزمایش ۲ (با توجه به تقسیم تصادفی نمونه‌ها) تقریباً یکسان و بدون تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد، همچنین در زمان نمونه‌گیری و پس از مداخله، بین وزن گروه کنترل با گروه آزمایش اول و نیز گروه کنترل با گروه آزمایش دوم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (در هر دو مورد $p \leq 0.008$)، ولی اختلاف وزن دو گروه آزمایشی معنی‌دار نبود. کاهش وزن، یکی از فاکتورهای مهم در طی مراحل ایجاد سرطان می‌باشد، این مطلب توسط دیگر محققین نیز به اثبات رسیده است (۱۹،۱۸). مطالعه حاضر نشان داد در مدل حیوانی، عفونت هلیکوباکتر پیلوری سبب ایجاد تغییراتی می‌شود که منطبق با تغییرات مشاهده شده در هیستوپاتولوژی سرطان معده

بروز بیان پروتئین COX-2 می گردد. مطالعات دیگر محققین نیز نشان داده است هلیکوباکتر پیلوری باعث بروز پروتئین COX-2 در سلول های سرطانی می شود (۲۵،۲۴،۱۳). در مطالعه حاضر مشخص گردید هلیکوباکتر پیلوری می تواند در دوره زمانی ۲۰ هفته از شروع آزمایش سبب تغییرات هیستوپاتولوژیکی مانند متاپلازیا، آدنوکارسینوما و التهاب های شدیدی در معده شود. همچنین در این خصوص، بررسی های دیگر محققین در زمان های ۲۴ و ۳۶ و ۵۲ هفته از آزمایش، بیانگر این مطلب می باشد (۲۱،۲۰،۱۳). مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نیز نشان داد در همین زمان پروتئین COX-2 در مخاط معده گروه های آزمایش بیان می شود. لازم به ذکر است که در خصوص بیان این پروتئین در این محدوده زمانی تاکنون گزارشی از دیگر محققین یافت نشده است. در مطالعه حاضر نشان داده شد به دنبال کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری، بیان پروتئین COX-2 در مراحل اولیه ایجاد سرطان معده روی می دهد. این امر می تواند در درمان و پیشگیری از سرطان در مراحل اولیه حایز اهمیت باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد هلیکوباکتر پیلوری باعث کاهش معنی داری در وزن حیوانات شده و از لحاظ تغییرات هیستوپاتولوژی، متاپلازیای ازوفازیال در معده موش های صحرایی ایجاد می کند و در طی این مراحل پروتئین COX-2 بیشتری نیز بیان می گردد. لذا می توان فرضیه ریسک فاکتور بودن هلیکوباکتر پیلوری را در ایجاد سرطان تأیید نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، آزمایشگاه های بافت شناسی و میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی کردستان در انجام این تحقیق کمال تشکر را داریم.

References:

1. Pellicano R, Fagoonee S, Palestro G, Rizzetto M, Ponzetto A. Intestinal Metaplasia, Dysplasia, Gastric Cancer and Helicobacter Pylori: Epidemiological Observations. Minerva Med 2005 Feb; 96(1):1-10.
2. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF. Changing Patterns in the Incidence of Esophageal and Gastric Carcinoma in the United States. Cancer 1998 Nov; 83(10):2049-53.
3. Noguchi Y, Yoshikawa T, Tsuburaya A. Is Gastric Carcinoma Different between Japan and the United States? Cancer 2000;89:2237-46.
4. Masserat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A, et al. Peptic Ulcer Disease Irritable Bowel Syndrome and Constipation in Two Populations in Iran. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7:427-33.
5. Warren JR. Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis. Lancet 1983;1:1273-5.
6. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter Pylori Infection: A Clinical Overview. Digestive and Liver Disease 2008;40:619-626.
7. Masae Tatematsu, Koji Nozaki, Tetsuya Tsukamoto. Helicobacter Pylori Infection and Gastric Carcinogenesis in Animal Models. Gastric Cancer 2003;6:1-7.
8. Kashiwagi H. Ulcers and Gastritis. Endoscopy 2005;37:110-5.
9. You WC, Li JY, Zhang L, Jin ML, Chang YS, Ma JL, et al. Etiology and Prevention of Gastric Cancer: A Population Study in a High-Risk Area of China. Chin J Dig Dis 2005;6(4):149-54.
10. Pasechnikov VD, Chukov SZ, Kotelevets SM, Mostovov AN, Mernova VP. Possibility of Non-Invasive Diagnosis of Gastric Mucosal Precancerous Changes. World J Gastroenterol 2004 Nov; 10(21):3146-50.
11. Li H, Kalies I, Mellgard B, et al. A Rat Model of Chronic Helicobacter Pylori Infection. Studies of Epithelial Cell Turn Over and Gastric Ulcer Healing. Scand J Gastroenterol 1998;33:370-8.
12. Yamac D, et al. Cyclooxygenase-2 Expression and Its Association with Angiogenesis, Helicobacter Pylori, and Clinicopathologic Characteristics of Gastric Carcinoma. Pathology Research and Practice 2008;204(8):527-536.
13. Nam KT, et al. The Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Nimesulide Prevents Helicobacter Pylori-Associated Gastric Cancer Development in a Mouse Model. Clin Cancer Res 2004;10(23):8105-13.

14. Achyut B, et al. Role of Cyclooxygenase-2 Functional Gene Polymorphisms in Helicobacter Pylori Induced Gastritis and Gastric Atrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2009;321(1-2):103-109.
15. Yanaoka K, et al. Preventive Effects of Etodolac, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, on Cancer Development in Extensive Metaplastic Gastritis, a Helicobacter Pylori-Negative Precancerous Lesion. *Int J Cancer* 2009;32(2):15-21.
16. Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, McDonough SP. An Immunohistochemical Study of Cyclooxygenase-2 Expression in Various Feline Neoplasms. *Vet Pathol* 2003;40:496-500.
17. Tetsuya Tsukamoto, Tsutomu Mizoshita, Masae Tatematsu. Animal Models of Stomach Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 2007;35:636-648.
18. Khalid U, Spiro A, Baldwin C, Sharma B, McGough C, Norman AR, Eisen T, O'Brien MER, Cunningham D, Andreyev HJ. Symptoms and Weight Loss in Patients with Gastrointestinal and Lung Cancer at Presentation. *Care Cancer* 2007;15:39-46.
19. Aminah Jatoi. Pharmacologic Therapy for the Cancer Anorexia/Weight Loss Syndrome: A Data-Driven, Practical Approach. *The Journal of Supportive Oncology* 2006;4:499-502.
20. Nobuyuki Shimizu, Ken-Ichi Inada, Hayao Nakanishi, Tetsuya Tsukamoto, Yuzuru Ikehara, Michio Kaminishi, Shu Kuramoto, Atsushi Sugiyama, Tsutomu Katsuyama, Masae Tatematsu. Helicobacter Pylori Infection Enhances Glandular Stomach Carcinogenesis in Mongolian Gerbils Treated with Chemical. *Carcinogens Carcinogenesis* 1999 April; 20(4):669-676.
21. Tomohiko Adachi, Yoshitsugu Tajima, Tamotsu Kuroki, Takehiro Mishima, Amane Kitasato, Noritsugu Tsuneoka. Chemopreventive Effects of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor (Etodolac) on Chemically Induced Intraductal Papillary Carcinoma of the Pancreas in Hamsters. *Carcinogenesis* 2008;29(4):830-833.
22. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji MS, Tsujii, Sun W, Gunawan ES, Hori M. Helicobacter Pylori Infection Induces Cyclooxygenase-2 Expression in Human. *Gastric Mucosa* 1998 November; 59(5):313-316.
23. Satoru Takahashi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto. Role of Cyclooxygenase-2 in Helicobacter Pylori-Induced Gastritis in Mongolian Gerbils. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G791-G798.
24. Walduck AK, et al. Identification of Novel Cyclooxygenase-2-Dependent Genes in Helicobacter Pylori Infection in Vivo. *Molecular Cancer* 2009;8:22-35.
25. Q Li, N Liu, B Shen, Zhou L, Wang Y, J Sun, Z Fan, RH Liu. Helicobacter Pylori Enhances Cyclooxygenase-2 Expression Via p38MAPK/ATF-2 Signaling Pathway in MKN45 Cells. *Cancer Lett* 2009 Jun; 8;278(1):97-103.

