

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±۸/۸۶)، ۷/۶ برابر (SD±۱۳/۰۹) و ۴/۳ برابر (SD±۱۲/۷) 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 سرطانزای گروه ۱ معرفی شده است (IARC 1994). تاکنون به دنبال مطالعات اپیدمیولوژیک و میکروبی شناسی سلولی انواع مختلفی از عوامل بیماری زایی در این باکتری، از جمله انکوپروتئین CagA و سیتوتوکسین VacA، و همچنین تحریک سیستم ایمنی منتج از میانکنش این عوامل با میزبان، به عنوان دلایل بروز سرطان در مبتلایان معرفی شده است. این میانکنش 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 رخدادهای ژنتیکی ثانویه غیرقابل 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 نشانگرهای 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، پیشرونده و طولانی مدت مشخص می شود (Sipponen and Maaros 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).

الفای پلی مورفیسم ها، شکست های تک رشته ای و دو رشته ای در DNA سلول های بافت معده از جمله رخدادهای ژنتیکی شناخته شده مبتلایان به سرطان معده می باشد (Cover And Blaser 1992) که فعال سازی مسیرهای ترمیم را از طریق (HR) Homologous Recombination و Non-Homologous End Joining (NHEJ) 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 الفای 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 هایی 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 معیارهای ورود به مطالعه یعنی دارای گاستریت مزمن خفیف یا متوسط و آلودگی یا عدم آلودگی با باکتری *H. pylori* بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. معیارهای 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

برای اندازه‌گیری برای ژن‌ها از واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real Time PCR به وسیله 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	
B2M-Reverse: TGAATCTTTGGAGTACGCTGG	۰۳/۵۸	۸۵
CHEK2-Forward: TTTGCCAATCTTGAATGTGTGAATG	۳/۵۹	
CHEK2-Reverse: GCCACTGTGATCTTCTATGTATGC	۵۵/۵۹	۱۸۹
DCLRE1C-Forward: CAACAGACCGCAACTCAGA	۸۱/۶۰	
DCLRE1C-Reverse: ATGAACCTCTCCAGTCTCACA	۵/۶۰	۱۹۸
XRCC4-Forward AGGCTTCTGAGAGATTGGAATGATG	۶۹/۶۰	
XRCC4-Reverse: GCAGTTTCCCCTTCTGTTTGATG	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 روش استفاده از روش *XRCC4* و *DLCRE1C* سنجدیده 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).

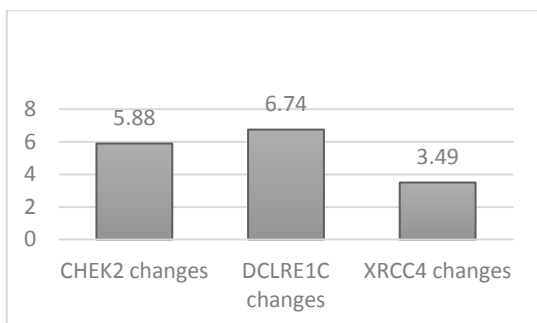
همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر ژن با استفاده از روش Real Time PCR یکسان و طبق جدول ۳ بود. رسم منحنی ذوب به وسیله اندازه گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمان های مختلف توسط دستگاه Real Time PCR صورت گرفت. در تمامی مراحل Real Time PCR از یک نمونه کنترل منفی جهت اطمینان از عدم آلودگی Master Mix واکنش، 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 وارد 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 ۳- برنامه حرارتی تکثیر ژن های *DLCRE1C*، *CHEK2*، *B2M*

<i>XRCC4</i>		
تعداد چرخه	زمان	دما (°C)
۱	۱۵ دقیقه	۹۵
۴۰	۱۰ ثانیه	۹۵
	۵ ثانیه	۶۲
	۵ ثانیه	۵۸
	۵ ثانیه	۵۵
	۱۵ ثانیه	۷۲

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

جنسیت	مورد (%) تعداد	شاهد (%) تعداد	مجموع (%) تعداد
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

جدول ۵- میانگین تغییرات بیان ژن‌های CHEK2، DCLRE1C و XRCC4 در گروه افراد مورد نسبت به شاهد

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

* RQ; Relative quantification. * SD; Standard deviation

بحث

مشخص: گاستریت فعال مزمن، گاستریت آتروفیک مزمن، متاپلازی روده‌ای (ابتدا نوع روده‌ای کامل یا کوچک) و سپس دیسپلازی (که به آن نئوپلازی داخل اپی تلیال نیز گفته می‌شود) و سرانجام سرطان تهاجمی. این فرآیند با عفونت با *H.pylori* آغاز و پایدار می‌ماند. اگرچه که کلنی‌های باکتری در محیط معده باقی می‌مانند، اما فرآیند التهابی را در مخاط معده القا می‌کنند که معمولاً ده‌ها سال به طول می‌انجامد و ممکن است منجر به از بین رفتن غدد معده (آتروفی) شود (Correa 2013).

با توجه به این که سرطان معده هنوز به‌عنوان یک بیماری مرگبار شناخته می‌شود، شناسایی نشانگرهای مولکولی، ژنتیکی و تغییرات اپی‌ژنتیکی و ویژگی‌های فارماکوژنتیک جدید ممکن است وضعیت تشخیص و درمان بیماران را بهبود بخشد و امیدهایی در زمینه توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی مؤثرتر ایجاد نماید و همچنین باعث افزایش آگاهی در زمینه ایجاد و نحوه گسترش سرطان معده شود. در سال‌های اخیر ارتباط بین RNAها و ژن‌های هدف آن‌ها 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 تکنیک‌های PCR به‌ویژه Real Time PCR گسترده شده است، می‌توان به سراغ روش‌های تشخیصی زودرس رفت، تا بتوان شانس بهبودی بیماران را افزایش و هزینه‌های تشخیص و درمانی آن‌ها 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 (گاستریت‌های مزمن خفیف و

در حال حاضر، *H.pylori* به‌عنوان یک عامل اتیولوژیک متداول در سرطان‌های مرتبط با عفونت در نظر گرفته می‌شود، که سهم نسبتاً زیادی از سرطان را در سراسر جهان شامل می‌شود. 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 استان‌های مختلف ایران ۳۶ تا ۹۰ درصد گزارش شده است.

عفونت *H.pylori* بزرگ‌ترین 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 می‌رود اکثریت به سمت التهاب مزمن پیشرفت کنند.

التهاب مزمن به‌عنوان یکی از عوامل خطر در بسیاری از انواع سرطان‌ها در نظر گرفته شده است. التهاب مزمن ناشی از عفونت *H.pylori* در مخاط معده به‌عنوان مرحله شروع در ایجاد سرطان معده در نظر گرفته می‌شود.

تحریک مزمن اپی‌تلیوم معده توسط آنتی ژن‌های *H.pylori* و همچنین سموم و سایر ترشحات در ارتباط با جذب سلول‌های سیستم ایمنی به مخاط معده (سایتوکین‌ها)، همه با هم، یک محیط ریز فعال شده را به نفع شروع زخم‌های بدخیم فراهم می‌کنند. درک پاسخ ایمنولوژیک به گاستریت ناشی از *H.pylori* و در نتیجه سرطان زایی، راهی روشن به سمت استراتژی‌های جدید علیه این عفونت مهم را فراهم می‌کند (Shamsdin et al. 2019). قبل از اینکه سرطان از نظر بالینی آشکار شود، یک فرآیند پیش سرطانی طولانی مدت انجام می‌شود، با مراحل متوالی کاملاً

باکتری *H. pylori* می‌باشد. همچنین ممکن است نشان‌دهنده که این باکتری با ایجاد شکست‌های دو رشته‌ای 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 ژن‌های مسیر NHEJ بر روی بافت معده پرداخته باشد، صورت نگرفته است. تغییرات بیان ژن‌های درگیر در ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای (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 مطالعه‌ای که توسط Bae et al. (2013) بر روی بافت معده مدل‌های 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 می‌باشد. این محققان اشاره کردند که بیان ژن *TP53* نیز در کنار ژن *CHEK2* افزایش پیدا کرده است که می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که سلول پس از توقف چرخه سلولی به علت بروز DSB، به سمت مرگ سلولی هدایت می‌شود (Bae et al. 2013). بر اساس این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *H. pylori* ممکن است سبب بروز شکست‌های دو رشته‌ای در DNA سلول‌های معده مدل‌های حیوانی شود و توقف چرخه سلولی را القاء کند. گزارشات از بیان ژن‌های *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 ژن‌های هدف و مقایسه آن با بیماران، عدم امکان بررسی سطوح تغییرات بیانی تمامی ژن‌ها و تنظیم گره‌های مسیر NHEJ، عدم تعیین میزان شکستگی DNA در سطح کروموزوم و شافلینگ‌ها و ترانسلوکیشن‌های احتمالی، و در نهایت عدم امکان بررسی ژنوم سویه‌های باکتریایی موجود در نمونه‌های بیماران و

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

ژن *CHEK2* که به‌عنوان یک ژن سرکوب‌گر سرطان (Tumor suppressor gene) تلقی می‌شود، در نمونه‌های مورد نسبت به شاهد به‌طور میانگین تا ۸۸/۵ برابر افزایش بیان داشته است. این افزایش بیان می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که در گروه مورد نسبت به شاهد، توقف چرخه سلول افزایش پیدا کرده است. این امر می‌تواند به علت آسیب‌های 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 می‌کند. بر اساس اطلاعات موجود، در زمان شکستگی DNA سیکل سلولی متوقف و سلول به سمت آپوپتوزیس یا ترمیم می‌رود. در توافق با این نتیجه، مطالعه‌ی مشابهی که توسط Hanada et al. (2014) انجام شد، گزارش شد که عفونت بافت معده توسط *H. pylori* سبب افزایش بیان ژن *CHEK2* می‌شود. این امر می‌تواند 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 (به‌عنوان یکی از پروتئین‌های اصلی مسیر ترمیم NHEJ می‌باشد، تا ۷/۶ برابر افزایش پیدا کرده است و می‌تواند نشان‌دهنده این امر باشد که مسیر NHEJ در گروه مورد نسبت به گروه شاهد فعالیت بیشتری کسب کرده و در صدد ترمیم آسیب‌های احتمالی وارد شده بر DNA، بر آمده است.

ژن *XRCC4* در مراحل آخر مسیر NHEJ ایفای نقش می‌کند (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 می‌تواند به علت نیاز کمتر سلول به پروتئین این ژن نسبت به ژن *DCLRE1C* باشد.

با توجه به نقش ژن‌های *CHEK2*، *DCLRE1C* و *XRCC4* در توقف چرخه سلولی و ترمیم DSB افزایش بیان این ژن‌ها 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 ژن‌های 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, Tieliu 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، XRCC4 و DCLRE1C 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, Maaros 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.