

بررسی غلظت اکسید نیتریک سنتاز آندوتلیوم در سرم افراد مبتلا به هلیکوباکترپیلوری

غلامحسین اتحاد^۱، فیروزه افشار قهرمانی^۲، یاسمین پهلوان^۳، مجتبی امانی^{۴*}

^۱ گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۲ پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۳ کارشناس ارشد فیزیولوژی، معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۴ گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۱۵۵۱۲۷۸۸ - فاکس: ۰۴۵۱۵۵۱۰۰۵۷ - E-mail: m.amani@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکسید آندوتلیومی آنزیمی است که فاکتوری درون زا به نام نیتریک اکسید را تولید می‌کند. این ماده نقش مهمی در بیماریهای نئوپلاستی ایفا می‌کند. در بیماریهای مزمن معده میزان بالای NO آسیب به DNA را افزایش می‌دهد. هدف از مطالعه حاضر بررسی غلظت اکسید نیتریک سنتاز آندوتلیوم در سرم افراد مبتلا به هلیکوباکترپیلوری در مقایسه با افراد سالم می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه ۸۴ نفر از زنان و مردان مراجعه کننده به آزمایشگاه پاتولوژی به صورت تصادفی انتخاب شدند. قبل از انجام نمونه گیری، ابتدا پرسشنامه ای به افراد واجد شرایط داده شد. جهت اندازه گیری آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری نمونه مدفوع و برای اندازه گیری میزان غلظت اکسید نیتریک سنتاز آندوتلیوم نمونه سرم افراد جمع آوری گردید. برای اندازه گیری آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری و غلظت eNOS نمونه های مدفوع و خون از کیت الایزا استفاده گردید. سپس نتایج ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری روش کیفی محاسبه و غلظت eNOS به صورت کمی اندازه گیری شد.

یافته ها: میانگین سنی این افراد در حدود $30/49 \pm 18/20$ سال بود. حداقل سن نمونه‌های مورد آزمون ۱ سال و حداکثر سن نمونه‌های مورد آزمون ۷۸ سال بود. از بین ۸۴ نمونه $58/3\%$ زن و $41/6\%$ از آنان مرد بودند. از نظر وجود بیماری خاص $70/2\%$ هیچ گونه بیماری نداشته $29/76\%$ افراد حداقل یک بیماری خاص را دارا بودند که عمدتاً بیماری های مربوط به تیروئید و پرفشاری خون را شامل می‌گردید. از نظر ابتلا به هلیکوباکترپیلوری حدود $16/66\%$ افراد دارای جواب آزمایش مشکوک، $29/76\%$ منفی و $53/57\%$ مثبت بودند.

نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که در افراد هلیکوباکترپیلوری مثبت، غلظت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز تغییر معنی داری نشان نمی‌دهد.

کلمات کلیدی: نیتریک اکسید سنتاز، هلیکوباکتر پیلوری، سرطان معده

دریافت: ۹۰/۱۰/۸ پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۴

* این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد.

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Ettehad GH, Afshar-Ghahramani F, Pahlavan Y, Amani M. The Seara Level of Endothelium Nitric Oxide Synthase in Positive Cases for *Helicobacter pylori* Stool Antigen. J Ardabil Univ Med Sci. 2013; 12 (5 Suppl.1): 7-15. (Full Text in Persian)

مقدمه

تحریک آندوتلیوم عروق توسط عوامل گشاد کننده عروقی همچون استیل کولین و کارباکول (ماده گشاد کننده عروق با نیمه عمر کوتاه) باعث ترشح عامل شل کننده مشتق از آندوتلیوم یا نیتریک اکساید (NO) از دیواره عروق می‌شود. این ماده با نام ماده گشاد کننده عروق نیز خوانده می‌شود و تقریباً در تمام بافتها یافت می‌گردد [۱،۲].

NO از طریق متابولیسم ال-آرژینین و نیز از راه غیر آنزیمی بوسیله احیای نیترات بوجود می‌آید، در شرایط اسیدی که برای بی‌هوایی‌ها سودمند می‌باشد، میکروارگانیسم‌هایی که در معده کولونیزه می‌شوند، می‌توانند نیترات غذا را به نیتریت تبدیل کنند و نیتریت در pH اسیدی سبب تولید NO می‌شود [۳،۴]. اکسیدنیتریک در تنظیم همودینامیک معده - روده‌ای برای حفظ جریان خون پایه ای مخاط شرکت می‌کند و بوسیله مهار چسبندگی ماست سیل ها و پلاکت ها و لکوسیت ها، مخاط را در مقابل پروسه التهابی حفاظت می‌کند [۲]. در مراحل اولیه در عفونتهای التهابی حاد و مزمن، التهاب مخاط را فرو می‌نشانند، ولی در سطوح بالا سبب گسترش بیماریهای نئوپلاستیک می‌گردد [۳].

زخم های دئودنال، زخم معده، کارسینوم معدی و لنفومای معدی و بیماری هایی در ارتباط با مری نظیر ریفلاکس معدی - مری از بیماری های ناشی از عفونت با هلیکوباکتر پیلوری هستند [۴].

سرطان معده دومین سرطان شایع در سطح جهان می‌باشد و میزان شیوع آن در مناطق و نژادهای مختلف یک کشور خاص متفاوت می‌باشد. در مناطق شمال غرب ایران مانند اردبیل به طور بارزتری شایع‌تر از مناطق مرکزی کشور مانند یزد می‌باشد [۵] در این میان نتایج مطالعات مختلف حاکی از آن است که اپیدمیولوژی عفونت با هلیکوباکترپیلوری مشابه اپیدمیولوژی سرطان معده می‌باشد و هم

چنین افزایش بروز سرطان معده به دنبال عفونت با هلیکوباکترپیلوری حدود ۴ برابر گزارش شده است، طبق مطالعات قبلی عفونت مزمن با هلیکوباکتر پیلوری موجب آتروفی مخاطی دیسپلازی روده ای، متاپلازی و در نهایت سرطان معده می‌شود [۵]. در عفونت مزمن با هلیکوباکتر پیلوری، سایتوکین‌ها سبب تحریک بیان اکسید نیتریک سنتاز (eNOS) می‌گردند. تولید آنزیم اکسید نیتریک سنتاز به صورت درون زاد در شبکه عصبی میانتریک و سلول‌های عضله صاف شروع می‌شود و غلظتی از NO تولید می‌گردد [۶،۷]. سه ایزوفرم ¹NOS شناسایی شده، فلاو پروتئین های حاوی هم که ال-آرژینین را به عنوان سوپسترا بکار می‌گیرد و به نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتیدفسفات نیاز دارد. فلاوین آدنین دی نوکلئوتید و تترا هیدرو بیوپترین نیز به عنوان کوفاکتور عمل می‌نماید [۸،۹].

عمدتاً دو ایزوفرم NOS را در مطالعات اخیر بیان می‌نمایند، یکی را بنام Inducible NOS و دیگری Constitutive NOS که آن را مرکب از دو ایزوفرم NOS یعنی eNOS¹، nNOS² می‌دانند [۷].

تقسیم‌بندی یک سری کتب بدین گونه است که nNOS را که در بافت عصبی و سلولهای اپی تلیال وجود دارد و توسط ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول فعال می‌گردد، به عنوان آنزیم ذاتی می‌خوانند (این مورد نیاز به عامل تحریک کننده ندارد). nNOS را به عنوان ایزوفرم I³ می‌شناسند. فسفریلاسیون بر روی فعالیت NO سنتاز اثر تنظیمی داشته و می‌تواند فعالیت این ایزوفرم را به مقدار قابل توجهی کاهش دهد [۷]. ایزوفرم II شامل ³iNOS که توسط آندوتلیوم سلولهای عضله صاف و ماکروفاژها ساخته می‌شود برای فعال شدن نیاز به اعمال تحریک دارد که به واسطه سایتوکین ها این

¹ Nitric Oxide Synthase

² Neuronal Nitric Oxide Synthase

³ Inducible Nitric Oxide Synthase

شناسایی یک راه تنظیمی جدید در تولید NOS شده است [۱۱].

سایتوکین های تولید شده در هلیکوباکتر پیلوری در عفونت مزمن مخاط معده، سبب تحریک بیان iNOS می شود که iNOS به مقدار زیاد در سلولهای ماهیچه صاف و شبکه عصبی میانتریک (بخشی از شبکه ی روده ای داخل پوشش عضلانی) وجود دارد، در حضور این فاکتورهای التهابی NF-κB به عنوان یک فاکتور رونویسی در هسته ی سلولهای اپی تلیوم معده فعال می شود بیان ژن iNOS می تواند سبب تولید غلظتی از NO در حد مقدار میکرومولار گردد [۱۲].

با توجه به شیوع بالای سرطان معده در استان اردبیل هدف اصلی این تحقیق سنجش مقدار eNOS در مبتلایان به عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. چنین مطالعه ای تا کنون در ایران انجام نشده است و از طرفی در صورت اثبات این مساله یعنی بالا رفتن غلظت eNOS در افراد مبتلا به هیکلوباکتر پیلوری با استفاده از مهارکننده های اختصاصی eNOS می توان میزان سرطان زائی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری و گسترش بیماری های پیش سرطانی را کاهش داد. در این راستا تلاش جهت یافتن عوامل داروئی جدید جهت ریشه کنی باکتری حائز اهمیت فراوان است که یکی از این روش ها می تواند تحقیقات در زمینه ی تغییرات میزان eNOS^۱ در افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری باشد. در یک سری مقالات اشاره گردیده که NO می تواند سبب از بین رفتن هلیکوباکتر پیلوری شود ولی چون تولید NO به اندازه کافی نمی باشد، توان از بین بردن باکتری را ندارد [۹].

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که نیتریک اکساید می تواند یک پاسخ دفاعی مثبت در میزبان برای محافظت مخاط معده از تهاجم ناشی از هلیکوباکتر پیلوری منعکس کند. از آنجا که تولید نیتریک اکساید در نتیجه ی بیان ژن آنزیم نیتریک

عمل انجام می پذیرد و به وسیله چند عامل رونوشت برداری کنترل می گردد [۶، ۸].

بیان ژن iNOS به فعالیت فاکتور رو نویسی NF-κB در هسته سلولهای اپی تلیوم بستگی دارد، خصوصاً بین فعالیت آن و بیان iNOS در گاستریت وابسته به هلیکوباکتر پیلوری رابطه وجود دارد [۳].
سایتوکین ها باعث متابولیسم ال-آرژینین به ال-سیترولین و اکسیدنیتریک می شوند [۶]. فعال ترین ایزوفرم در بین سه NOS شناخته شده را، iNOS می دانند [۶].

برخلاف دو ایزوآنزیم دیگر iNOS بطور پیوسته بیان نمی شود و بستگی به پاسخ نسبت به آندوتوکسین باکتری بوسیله اثر تحریکی یک سری سایتوکاین شامل لیپوپلی ساکارید و TNF-α دارد که آنها سبب آزاد سازی NO می شوند [۹].

ایزوفرم III شامل eNOS می باشد، توسط سلولهای آندوتلیال تولید می گردد و برای بیان نیاز به کلسیم دارد. برخلاف nNOS فسفریلاسیون آن بوسیله یک سرین- ترئونین پروتئین کیناز، باعث فعال شدن آن می گردد [۹].

به دنبال تولید NO تکثیر سلولها آغاز می گردد و همین طور فرآیندهایی از قبیل آنژیوژنز، افزایش قطر عروق و افزایش جریان خون اتفاق می افتد که سبب فراهم آمدن اکسیژن و ریز مغذی کافی برای تومور می گردد پس NO نقش مهمی را در توسعه بیماری های نئوپلاستیک ایفا می کند [۹، ۸]. بیان ژن iNOS به فعالیت فاکتور رو نویسی NF-κB در هسته سلولهای اپی تلیوم بستگی دارد، خصوصاً بین فعالیت آن و بیان iNOS در گاستریت وابسته به هلیکوباکتر پیلوری رابطه وجود دارد [۱۰].

سایتوکین ها باعث متابولیسم ال-آرژینین به ال-سیترولین و اکسیدنیتریک می شوند [۶]. نقش NO و مهار کننده آن در رابطه با گاستریت و آسیب مخاط معده ناشی از هلیکوباکتر پیلوری امروزه سبب

¹ Endothelium Nitric Oxide Synthase

نمونه مدفوع و محلول داخل Extraction tube کاملاً و به خوبی مخلوط شد. محلول بافر شستشو را به نسبت یک، بیست و پنجم به وسیله آب دیونیزه شده (فوق خالص) رقیق نموده، سپس از پلیت دارای چاهک (۹۶ چاهک) استفاده شد.

چاهک A_1 و A_2 را به عنوان شاهد قرار داده و سپس حدود ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتور ۱ به وسیله سمپلر به چاهک B_1 و B_2 اضافه شد (رنگ کالیبراتور ۱ زرد بود) و بعد از آن حدود ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتور ۲ به چاهک C_1 و C_2 اضافه شد (رنگ آن آبی بود) سپس حدود ۵۰ میکرو لیتر از کالیبراتور ۳ به چاهک D_1 و D_2 اضافه شد (رنگ آن نیز آبی بود) و در آخر حدود ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتور ۴ به چاهک E_1 و E_2 اضافه شد (به رنگ آبی). نوک Extraction tube شکسته شد و حداکثر ۲ قطره از محلول به چاهک‌های مربوط به نمونه اضافه گردید، بعد ۵۰ میکرولیتر محلول کنژوگه به تمام چاهک ها به استثنای چاهک شاهد اضافه شد. به مدت ۳۰ ثانیه پلیت را تکان داده درب چاهک با برچسب مخصوص پلیت پوشانده شد و ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. محتویات چاهک ها با محلول شستشوی آماده مصرف ۵ بار شستشو شده، پس از شستشو پلیت به مدت دو دقیقه روی کاغذ صافی قرار می گرفت تا خشک شود.

۵۰ میکرولیتر از سوبسترای A به تمام چاهک ها اضافه شد و پس از آن ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای B به تمام چاهک ها افزوده شد. در این مرحله در چاهک های حاوی نمونه مثبت رنگ آبی پدیدار گردید، پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده، درب چاهک با برچسب مخصوص پلیت پوشانده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. بعد از ده دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به تمامی چاهک ها اضافه گردید. در این مرحله در چاهک های حاوی نمونه مثبت رنگ زرد پدیدار شد.

اکساید سنتاز می‌باشد، بر آن شدید تا غلظت اکسید نیتریک سنتاز اندوتلیوم را در سرم افراد مبتلا به هلیکوباکترپیلوری و ارتباط آن را مورد بررسی قرار دهیم.

روش کار

در این مطالعه ۸۴ نفر از زنان و مردان مراجعه کننده به آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان امام خمینی و آزمایشگاه فارابی شهر اردبیل به صورت تصادفی انتخاب شدند. قبل از انجام نمونه گیری، ابتدا پرسشنامه ای به افراد واجد شرایط داده شد. در این پرسشنامه ها اطلاعات شامل سن، جنس، شغل، قد، وزن، استعمال دخانیات، وجود بیماری خاص در فرد و سابقه بیماری خاص در بستگان درجه یک با ذکر نسبت فامیلی و نوع بیماری از شخص مصاحبه شونده مد نظر بود. گروه مورد مطالعه قبل از انجام نمونه گیری رضایت خود را از انجام آزمایش اعلام نمودند. این افراد به صورت سرپایی به آزمایشگاه ها مراجعه داشتند.

جهت اندازه گیری آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری نمونه مدفوع و برای اندازه گیری میزان غلظت اکسید نیتریک سنتاز آندوتلیوم نمونه سرم افراد جمع آوری گردید. پس از جمع آوری کلیه نمونه ها (سرم و مدفوع) در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد در فریزر آزمایشگاه سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل نگهداری گردید و در زمان انجام آزمایش از فریزر خارج شد. برای اندازه گیری آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری نمونه های مدفوع از کیت ایذا استفاده گردید.

سنجش آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع

آماده سازی نمونه مدفوع

ابتدا با قاشق مخصوص از سه نقطه مختلف حدود ۳۰ میلی گرم از نمونه مدفوع برداشت شد سپس

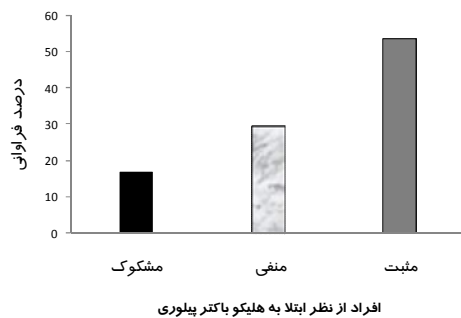
استفاده از آزمون t-test ارتباط بین سن، جنس، شغل، بیماری خاص، سیگار کشیدن و موارد ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری با غلظت eNOS محاسبه شد.

یافته ها

در مطالعه حاضر میانگین سنی افراد در حدود $30/49 \pm 18/20$ سال بود حداقل سن نمونه مورد آزمون ۱ سال و حداکثر ۷۸ سال بود.

از بین ۸۴ نمونه $13/09\%$ زیر ۱۰ سال، $21/42\%$ بین ۱۰ تا ۲۰ سال، $58/33\%$ بین ۲۱ تا ۵۹ سال و $7/14\%$ سن ۶۰ به بالا داشتند. از بین ۸۴ نمونه $58/3\%$ نفر زن و $41/6\%$ نفر مرد بودند.

از نظر ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری حدود $16/66\%$ افراد مشکوک، $29/76\%$ افراد منفی و $53/57\%$ مثبت بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱. نمودار در صد فراوانی گروههای مختلف از نظر ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری

در افراد هلیکو باکتر مثبت میانگین غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع شان $0/233 \text{ mg/ml}$ و میانگین غلظت eNOS در سرم شان $492/24 \text{ mg/ml}$ در افراد هلیکوباکتر منفی میانگین غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع شان $0/1 \text{ mg/ml}$ و میانگین غلظت eNOS، $282/32 \text{ Pg/ml}$ در افراد مشکوک میانگین غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری، $0/162 \text{ mg/ml}$ و میانگین غلظت eNOS، $135/04 \text{ Pg/ml}$ بود.

سپس میزان جذب نوری در طول موج 630 nm - 450 قرائت شد.

آنالیز کیفی غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری

محاسبه نتایج به روش کیفی

در ابتدا با استفاده از فرمول cut off value در جذب نوری 450 نانومتر محاسبه شد و نتایج غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری به روش کیفی طبق جدول ۱ بررسی می‌شود.

جدول ۱. نتایج غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری به روش کیفی

Result	Qualitative	Qualitative
	Index Value	Concentration
Negative	$< 0/9$	$< 0/045 \text{ mg/ml}$
Positive	$> 1/1$	$> 0/055 \text{ mg/ml}$
Equivocal	$\geq 0/9$ و $\leq 1/1$	$< 0/045 - 0/055 \text{ mg/ml}$

اندازه گیری کمی غلظت eNOS

اساس سنجش

با تکنیک الیزا غلظت eNOS از نظر کمی سنجش شد. یک آنتی بادی منوکلونال ویژه برای eNOS داخل یک میکروپلیت قرار داده شده است. استاندارد و نمونه ها داخل چاهک ریخته شد و eNOS به آنتی بادی وصل گردید. بعد از شستشوی هر ماده غیر باند شده، یک آنتی بادی پلی کلونال ویژه برای eNOS و متصل به آنزیم داخل چاهک ها اضافه شد. در ادامه ی شستشو برای برداشت هر معرف آنتی بادی - آنزیم غیر باند شده، یک محلول سوبسترا به چاهک ها اضافه شده و رنگ در یک نسبتی با یک مقدار eNOS باند شده در مرحله آغازی تولید می‌شود و سپس تولید رنگ متوقف می‌شود و شدت رنگ اندازه گیری می‌شود.

معرف ها آماده سازی شده و تمامی معرف ها و نمونه ها به داخل حرارت اتاق در آزمایشگاه سلولی مولکولی (دانشگاه علوم پزشکی اردبیل) انتقال و پروسه سنجش بر روی آنها انجام شد. در ادامه با استفاده از نرم افزار Excel غلظت eNOS بر اساس مقدار جذب در 450 نانومتر رسم گردیده و با

بحث

بررسی اخیر مربوط به ارتباط غلظت eNOS و ابتلا به هلیکوباکتریپیلوری بود در مطالعه مربوط به شهر اردبیل مشخص گردید که ارتباط معنی‌داری بین غلظت eNOS و ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری وجود ندارد اما در کشورهای اروپائی این ارتباط معنی‌دار گزارش شده است [۱، ۴]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که در افراد هلیکو باکتریپیلوری مثبت، بیان زودرس و بیش از حد eNOS سبب ساخته شدن اکسید نیتریک می‌گردد و تولید بیش از حد آن سبب ایجاد متابولیت‌های اکسیداتیو سمی می‌گردد و بوسیله‌ی واکنش با ملکول‌های بیولوژیک اعم از پروتئین‌ها، نری گلیسریدها و اسیدنوکلئیک، هموستاز سلولی بر هم می‌خورد و همین‌طور اکسید نیتریک در فرآیند تومورزایی و پیشرفت تومور از طریق آنژیوژنز و افزایش توالی انتقال پیام ضد آپوپتوز نقش دارد [۱۳].

تعداد نمونه‌ی مورد مطالعه در این کشورها حدود ۲۸۸ نمونه بود که این امر می‌تواند میزان دقت را بالا ببرد. دیده شده که اکسید نیتریک در مراحل اولیه‌ی التهاب سبب تخفیف پروسه‌ی التهابی شده و از تخریب سلولی جلوگیری می‌گردد که در این مراحل غلظت آن چندان افزایش یافته نیست [۸]. پس یکی از موارد اختلاف مطالعه‌ی ما با آنها می‌تواند تعداد کم نمونه (۸۴ نمونه) باشد، در این صورت میزان دقت پائین آمده چون ممکن است تعدادی از آنها پروسه‌ی اولیه‌ی التهاب را پشت سر بگذارند و گاستریت آن‌ها در حد خفیف بوده و سبب شود که غلظت eNOS و به تبع آن میزان NO خیلی بالا نرود. از طرفی یکی از موارد اختلاف بین مطالعات ما و کشورهای اروپائی احتمالاً مربوط به نژاد می‌باشد. در مطالعات قبلی در نژاد مغول که اغلب آنها زرد پوست با موهای مشکی و رنگ چشم تیره می‌باشند میزان غلظت eNOS در افراد هلیکوباکتر پیلوری

مثبت اندازه‌گیری شده و دیده شده که میزان غلظت eNOS در آن‌ها بالا است [۱۴]. در نژاد اروپائی که اغلب آن‌ها سفید پوست با موهای بلوند با رنگ چشم روشن می‌باشند نیز رابطه‌ی معنی‌دار بین غلظت eNOS و ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد در حالیکه روی نژاد آریایی، و خاورمیانه‌ای تا کنون مطالعه اختصاصی صورت نگرفته است و مطالعه حاضر برای اولین بار در این نژاد انجام یافته است. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که در افراد هلیکو باکتریپیلوری مثبت مبتلا به دیابت نوع دو، eNOS بیش از حد بیان نمی‌شود. دیده شده بود که در دیابت به عنوان یک اختلال عروقی میزان گلوکوتایون که مهم‌ترین ترکیب محلول حاوی سولفیدریل داخل سلول است کم می‌شود و اثر پراکسی نیترات به عنوان یک رادیکال آسیب‌رسان که خود توسط محتوای گلوکوتایون سلولی کنترل می‌شود در اینجا خود را نشان می‌دهد، که سبب افزایش بروز عوارض قلبی-عروقی در افراد دیابتیک می‌شود. چون اگر NO به مقدار کافی تولید می‌شد در شرایط فیزیولوژیک با گلوکوتایون وارد واکنش می‌شد و با ایجاد اِس-نیتروزو گلوکوتایون که فرم پایدارتر NO بوده، می‌توانست نقش خود را که گشاد کنندگی عضلات صاف عروقی است به خوبی ایفا کند [۹]. در ادامه باید اشاره کرد که ارتباط بین غلظت eNOS و افراد هلیکو باکتریپیلوری مثبت دیابتیک معنی‌دار نمی‌باشد. پس یکی از علل تفاوت ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری و غلظت eNOS در مطالعه‌ی ما احتمالاً به این دلیل می‌تواند باشد که تعدادی از افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری، دیابتیک بوده‌اند (تیپ دو) که خود از ابتلایشان به دیابت مطلع نبوده‌اند.

یکی از دلایل اختلاف نیز مربوط به عامل پاتوژنیک هلیکوباکتر پیلوری مانند CagA می‌باشد. در مطالعات قبلی انجام یافته بر روی افراد هلیکوباکترپیلوری مثبتی که دارای CagA مثبت هستند (CagA) به عنوان عامل پاتوژنیک که سبب

بوده و فقط مبتلا به گاستریت مزمن سطحی بودند. این امر نشان می‌دهد که بخشی از اختلاف نتایج می‌تواند ناشی از نوع هلیکوباکتر پیلوری از نظر CagA باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که در افراد هلیکوباکترپیلوری مثبت، غلظت eNOS افزایش معنی‌داری ندارد. بدلیل شیوع بالای سرطان معده در استان اردبیل انجام مجدد این آزمایش در شهر اردبیل با تعداد نمونه بیشتر پیشنهاد می‌شود.

تسهیل تکثیر هلیکوباکتر پیلوری در مخاط معده و ایجاد زخم معده و سرطان می‌شود) میزان غلظت eNOS بیشتر بوده، البته در مواردی که در این افراد منجر به ایجاد گاستریت آتروفیک، متاپلازی و دیس پلازی روده ای شده بود [۸]. دلیل بالا بودن غلظت eNOS در این افراد این است که CagA خود می‌تواند سبب تحریک بیان iNOS و eNOS شود. رابطه ی بین غلظت eNOS و میزان آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع افراد هلیکوباکتر پیلوری مثبتی که CagA مثبت بودند معنی دار بود ($p=0.001$). ولی در افراد هلیکوباکتر پیلوری مثبتی که CagA منفی بودند میزان غلظت eNOS پایین

References

- Langston W, Childow JH, Booth BH, Barlow SC, Lefer DJ, Patel RP. Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1 governs VEGF-A-mediated eNOS activity and angiogenesis. *Free Rad Biol Med*. 2007 Mar; 42:720-729.
- Moncada S, Higgs A, Synder SH, Macmicking J. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes. *J Med*. 1998 Sep; 210(7):557-91.
- Wang H, Zhou Y, Peng T, Zhang Z, Tiang DJ, Hi YJ. Role of endogenous nitric oxide synthase inhibitor in gastric mucosal injury. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Mar; 86(3):97-104.
- Mandel D, Douglas H, Bennet F. Principles and practice of infection disease. 6thed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone, 2005:39-48.
- Mikaeli J, Malekzadeh R, Ziad Alizadeh B, Nasser Mogaddam S, Valizadeh M, Khoncheh R, et al. Prevalence of helicobacter pylori in two iranian provinces with high and low incidence of gastric carcinoma. *Tehran University Medical Journal, TUMJ*. 1999;57(1) : 34-38. (Full text in Persian).
- Chen CH, Hsieh FJ, Ming Y, Chang KJ, Huang P, Lee MJ. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo oxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *J Surgical Oncology*. 2006 Mar; 94 (3):226-233.
- Wang YF, Guo CL, Zhao LZ, Yang GA, Chen P, Wang HK. Effect of Helicobacter pylori infection on gastric mucosal pathologic change and level of nitric oxide synthase. *J Gastroenterol*. 2005 Aug; 11(32): 5029-31.
- Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, et al. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in gastric mucosa of gastric cancer patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jun; 19(2):139-45.
- Lazaraki G, Koutoras J, Metallidis S, Vrettou E, Tzioufa V, Germandis G, et al. Helicobacter pylori infection upregulates endothelial nitric oxide synthase expression and induces angiogenesis in gastric mucosa of dyspeptic patients. *J Gastroenterology and Hepatology*. 2008 Feb; 20(3):441-49.
- Van dar woude CJ, Tansen PL, Teibosch GM, Homan M, Beuving A, Kleibouker JH, et al. Apoptosis and expression of iNOS, COX-1 and COX-2 in gastritis and intestinal Metaplasia inducible nitric oxide synthase is highly specific for intestinal metaplasia. *Eur J Gastroentrol Hepatol*. 2002 Aug; 14(5):27-34.

- 11- Antos D, Enders G, Rieder G, Stolte M, Bayerdörffer E, Hatz RA. Inducible nitric oxide synthase expression before and after eradication of *Helicobacter pylori* in different forms of gastritis. *Immunol Med Microbiol. FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001 Mar; 30(2):127-31.
- 12- Liu Z, Zing Y, Hao H, Gupta K, Xu J, Chu L. Endothelial nitric oxide synthase is dynamically expressed during bone marrow stem cell differentiation into endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ.* 2007 Sep; 45(3):372-5.
- 13- Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C. Nitric oxide promotes murine mammary tumor growth and metastasis by stimulating tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2000 Apr; 86(1):30-9.
- 14- Elfvin A, Bolin I, Lonroth H, Fandriks L. Gastric expression of inducible nitric oxide synthase and myeloperoxidase in relation to nitrotyrosine in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Sep; 41(9):1013-8.

The Serum Levels of Endothelium Nitric Oxide Synthase in Positive Cases for *Helicobacter pylori* Stool Antigen

Ettehad GH¹, Afshar-Ghahramani F², Pahlavan Y³, Amani M^{4*}

¹ Department of Microbiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran.

² General practitioner, School of Medicine, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran.

³ MSc of Physiology, Deputy of research, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran.

⁴ Department of Basic sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran.

* Corresponding Author. Tel: +984515512788 Fax: +984515510057 E-mail: m.amani@arums.ac.ir

Received: 28 December 2011 Accepted: 4 March 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: Endothelium nitric oxide synthase (eNOS) is a type of enzyme which produces an endogenous factor called nitric oxide (NO). NO plays important role in progress of euplastic diseases. In chronic gastritis, the increased level of NO causes damages to DNA. The aim of present study is to evaluate eNOS concentration in sera of healthy people and those infected by *Helicobacter pylori*.

Methods: The sera and stool specimens from 84 voluntaries (Female: 58.3%, Males 41.6%) were collected. *Helicobacter pylori* antigen in the stool specimens and eNOS levels in sera were determined using ELISA. Obtained data were analyzed using Excell software.

Results: The age range was from 1 to 78 years old (Mean: 30 years old). In terms of special diseases, 70.2% did not have any special diseases, but 29.76% showed at least one special disease, mainly thyroid disease and hypertension. The results for *H. pylori* stool antigen detection showed that 16.6%, 29.76% and 53.57% of collected specimens were equivocal, *Helicobacter pylori* negative and positive respectively. Comparison of sera concentrations of eNOS showed that there is no significant change among these three groups.

Conclusion: As mentioned in results, the eNOS sera concentrations showed no significant change in *Helicobacter pylori* positive and negative groups. Albeit the other studies showed the significant increase in serum concentration of *Helicobacter pylori* positive patient, this controversy may arise from race and variations in *Helicobacter pylori* pathogenic islands such as those containing VacA and CagA. We propose to conduct a similar study in Ardabil to focus on the pathogenic islands of *H. pylori* strains in this province.

Keyword: Nitric Oxide Synthase; *Helicobacter pylori*; Gastric Cancer

Ettehad GH, Afshar-Ghahramani F, Pahlavan Y, Amani M. The Seara Level of Endothelium Nitric Oxide Synthase in Positive Cases for *Helicobacter pylori* Stool Antigen. J Ardabil Univ Med Sci. 2013; 12 (5 Suppl.1): 7-15. (Full Text in Persain)