

بررسی غلظت اکسید نیتریک سنتاز آندوتلیوم در سرم افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری

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

^۱ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۲ پزشک عمومی، دانشکده علوم 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 هلیکوباکتر پیلوری 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 هلیکوباکتر پیلوری 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 هلیکوباکتر پیلوری 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 می شود. این ماده با نام ماده گشاد کننده عروق نیز خوانده می شود و تقریباً در تمام بافتها یافت می گردد [۱،۲].

NO از طریق متابولیسم ال-آرژنین و نیز از راه غیر آنزیمی بوسیله احیای نیترات بوجود می آید، در شرایط اسیدی که برای بی هوازی ها سودمند می باشد، میکروارگانیسم هایی که در معده کولونیزه می شوند، می توانند نیترات غذا را به نیتریت تبدیل کنند و نیتریت در pH اسیدی سبب تولید NO می شود [۳،۴]. اکسیدنیتریک در تنظیم همودینامیک معده - روده ای برای حفظ جریان خون پایه ای مخاط شرکت می کند و بوسیله مهار چسبندگی ماست سیل ها و پلاکت ها و لکوسیت ها، مخاط را در مقابل پروسه التهابی حفاظت می کند [۲]. در مراحل اولیه در عفونتهای التهابی حاد و مزمن، التهاب مخاط را فرو می نشاند، ولی در سطوح بالا سبب گسترش بیماریهای نئوپلاستیک می گردد [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 می باشد و میزان شیوع آن در مناطق و نژادهای مختلف یک کشور خاص متفاوت می باشد. در مناطق شمال غرب ایران مانند اردبیل به طور بارزتری شایع تر از مناطق مرکزی کشور مانند یزد می باشد [۵] در این میان نتایج مطالعات مختلف حاکی از آن است که اپیدمیولوژی عفونت با هلیکوباکترپیلوری مشابه اپیدمیولوژی سرطان معده می باشد 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 می شود [۵]. در عفونت مزمن با هلیکوباکتر پیلوری، سایتوکین ها سبب تحریک بیان اکسید نیتریک سنتاز (eNOS) می گردند. تولید آنزیم اکسید نیتریک سنتاز به صورت درون زاد در شبکه عصبی میانتریک و سلول های عضله صاف شروع می شود و غلظتی از NO تولید می گردد [۶،۷]. سه ایزوفرم NOS^۱ شناسایی شده، فلاو پروتئین های حاوی هم که ال-آرژنین را به عنوان سوسترا بکار می گیرد و به نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات نیاز دارد. فلاوین آدنین دی نوکلئوتید و تترا هیدرو بیوپترین نیز به عنوان کوفاکتور عمل می نماید [۸،۹].

عمدتاً دو ایزوفرم NOS را در مطالعات اخیر بیان می نمایند، یکی را بنام Inducible NOS و دیگری Constitutive NOS که آن را مرکب از دو ایزوفرم NOS یعنی nNOS^۲، eNOS^۱ می دانند [۷].

تقسیم بندی 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 می گردد، به عنوان آنزیم ذاتی می خوانند (این مورد نیاز به عامل تحریک کننده ندارد). nNOS را به عنوان ایزوفرم I^۳ می شناسند. فسفریلاسیون بر روی فعالیت NO سنتاز اثر تنظیمی داشته و می تواند فعالیت این ایزوفرم را به مقدار قابل توجهی کاهش دهد [۷]. ایزوفرم II شامل iNOS^۳ که توسط آندوتلیوم سلولهای عضله صاف و ماکروفاژها ساخته می شود 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

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 IL-۱۰ آرژنین به IL-۱ سیترولین و اکسیدنیتریک می شوند [۶]. فعال ترین ایزوform در بین سه NOS شناخته شده را، iNOS می دانند [۶].

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

ایزوform 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 سلول ها 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 IL-۱۰ آرژنین به IL-۱ 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

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 هلیکوباکتر 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 دارویی 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 میزان 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

^۱ Endothelium Nitric Oxide Synthase

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 الیزا 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

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.

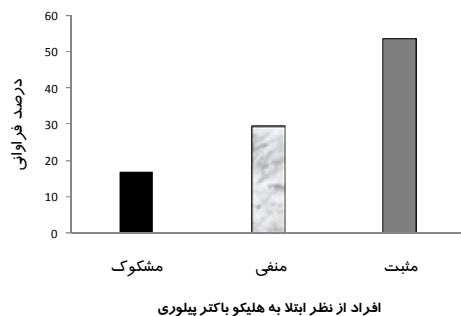
استفاده از آزمون t-test ارتباط بین سن، جنس، شغل، بیماری خاص، سیگار کشیدن و موارد ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری با غلظت eNOS محاسبه شد.

یافته ها

در مطالعه حاضر میانگین سنی افراد در حدود 30.49 ± 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 58.33% نفر زن و 41.66% 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 mg/ml و میانگین غلظت eNOS در سرم شان 492.24 pg/ml در افراد هلیکوباکتر منفی میانگین غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع شان 0.1 mg/ml و میانگین غلظت eNOS، 283.32 pg/ml در افراد مشکوک میانگین غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری، 0.162 mg/ml و میانگین غلظت eNOS، 135.04 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 می‌شد.

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	$0.9 \leq 1.1$	$0.045 - 0.055 \text{ mg/ml}$

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 هلیکوباکتریلوری بود در مطالعه مربوط به شهر اردبیل مشخص گردید که ارتباط معنی داری بین غلظت eNOS و ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری وجود ندارد اما در کشورهای اروپائی این ارتباط معنی دار گزارش شده است [۱، ۴]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که در افراد هلیکو باکتریلوری مثبت، بیان زودرس و بیش از حد eNOS سبب ساخته شدن اکسید نیتریک می گردد و تولید بیش از حد آن سبب ایجاد متابولیت های اکسیداتیو سمی می گردد و بوسیله ی واکنش با ملکول های بیولوژیک اعم از پروتئین ها، نری گلیسریدها و اسیدنوکلئیک، هموستاز سلولی بر هم می خورد و همین طور اکسید نیتریک در فرآیند تومورزایی و پیشرفت تومور از طریق آنژیوژنز و افزایش توالی انتقال پیام ضد آپوپتوز نقش دارد [۱۳].

تعداد نمونه ی مورد مطالعه در این کشورها حدود ۲۸۸ نمونه بود که این امر می تواند میزان دقت را بالا ببرد. دیده شده که اکسید نیتریک در مراحل اولیه ی التهاب سبب تخفیف پروسه ی التهابی شده و از تخریب سلولی جلوگیری می گردد که در این مراحل غلظت آن چندان افزایش یافته نیست [۸]. پس یکی از موارد اختلاف مطالعه ی ما با آنها می تواند تعداد کم نمونه (۸۴ نمونه) باشد، در این صورت میزان دقت پائین آمده چون ممکن است تعدادی از آنها پروسه ی اولیه ی التهاب را پشت سر بگذارند و گاستریت آن ها 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 می باشد. در مطالعات قبلی در نژاد مغول که اغلب آنها زرد پوست با موهای مشکی و رنگ چشم تیره می باشند میزان غلظت eNOS در افراد هلیکوباکتر پیلوری

مثبت اندازه گیری شده و دیده شده که میزان غلظت eNOS در آنها بالا است [۱۴]. در نژاد اروپایی که اغلب آنها سفید پوست با موهای بلوند با رنگ چشم روشن می باشند نیز رابطه ی معنی دار بین غلظت eNOS و ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد در حالیکه روی نژاد آریایی، و خاورمیانه ای 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 باکتریلوری مثبت مبتلا به دیابت نوع دو، eNOS بیش از حد بیان نمی شود. دیده شده بود که در دیابت به عنوان یک اختلال عروقی میزان گلوکاتایون که مهم ترین ترکیب محلول حاوی سولفیدریل داخل سلول است کم می شود و اثر پراکسی نیترات به عنوان یک رادیکال آسیب رسان که خود توسط محتوای گلوکاتایون سلولی کنترل می شود در اینجا خود را نشان می دهد، که سبب افزایش بروز عوارض قلبی- عروقی در افراد دیابتیک می شود. چون اگر NO به مقدار کافی تولید می شد در شرایط فیزیولوژیک با گلوکاتایون وارد واکنش می شد و با ایجاد اِس- نیتروزو گلوکاتایون که فرم پایدارتر NO بوده، می توانست 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 باکتریلوری مثبت دیابتیک معنی دار نمی باشد. پس یکی از علل تفاوت ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری و غلظت eNOS در مطالعه ی ما احتمالاً به این دلیل می تواند باشد که تعدادی از افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری، دیابتیک بوده اند (تیپ دو) که خود از ابتلایشان به دیابت مطلع نبوده اند.

یکی از دلایل اختلاف نیز مربوط به عامل پاتوژنیک هلیکوباکتر پیلوری مانند CagA می باشد. در مطالعات قبلی انجام یافته بر روی افراد هلیکوباکتر پیلوری 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 هلیکوباکتر پیلوری 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

- 1- 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.
- 2- 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.
- 3- 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.
- 4- Mandel D, Douglas H, Bennet F. Principles and practice of infection disease. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone, 2005:39-48.
- 5- 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).
- 6- 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.
- 7- 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.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- Van der 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 Gastroenterol 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 angio genesis. *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)