



ارتباط پلی مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 با خطر ابتلا به زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری در جمعیت استان گیلان

سیده طنناز کمونه^۱، رسول زحمتکش رودسری^{۱*}

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۲

چکیده

مقدمه: زخم پپتیک از شایع‌ترین بیماری‌های گوارشی در انسان است. عفونت هلیکوباکتریلوری یک عامل اصلی بروز زخم پپتیک است. TLRها با شناسایی قسمت‌های خاص باکتری‌ها، مسیر پیام‌رسانی سیستم ایمنی ذاتی را تنظیم می‌نمایند. TLR4 با تشخیص لیپوپلی ساکاریدهای پاتوژن‌ها، پاسخ‌های ایمنی را علیه آنها فعال می‌نماید. هدف از این مطالعه بررسی اثر پلی مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 با استعداد ابتلا به زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موردی-شاهدی، ۱۰۷ بیمار مبتلا زخم پپتیک دارای عفونت به هلیکوباکتریلوری و ۱۲۳ فرد سالم بررسی شدند. پس از استخراج DNA، فراوانی ژنوتیپی دو پلی مورفیسم با روش Tetra Prime ARMS-PCR تعیین گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج: اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی GG ($\chi^2=11/91$ ، $P=0/001$) و آللی G ($\chi^2=14/87$ ، $P=0/0001$)، اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی TT ($\chi^2=7/95$ ، $P=0/005$) و آللی T ($\chi^2=2/04$ ، $P=0/60$)، و فراوانی ژنوتیپی rs4986790 مربوط به جایگاه rs4986790 و فراوانی ژنوتیپی rs4986791 (OR=1/57، CI=1/19-2/07، $P=0/001$) و آللی T ($\chi^2=10/40$ ، $P=0/001$) مربوط به جایگاه rs4986791 ژن TLR4 با بیماری زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری در میان گروه بیمار و کنترل مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج آنالیز آماری نشان داد که حضور آلل‌های G و T در ژن TLR4، را می‌توان یک فاکتور خطر احتمالی برای ابتلا به زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری مطرح نمود. با این حال جهت تأیید نتایج، مطالعه بر روی جمعیت‌های مختلف و بزرگ‌تر مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، زخم پپتیک، ژن TLR4، هلیکوباکتریلوری.

*نویسنده مسئول: تنکابن- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، تلفن: +۹۸۱۱۵۴۲۷۱۱۰۵، نمابر: Email: zahmatkesh.rasoul@gmail.com +۹۸۱۱۵۴۲۷۴۴۰۹

ارجاع: کمونه سیده‌طنناز، زحمتکش رودسری رسول. ارتباط پلی مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 با خطر ابتلا به زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری در جمعیت استان گیلان. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۲۰(۱):۹-۲۰.



مقدمه

زخم پپتیک (Peptic Ulcer Disease)، زخم‌های باز در دستگاه گوارش بوده که در لایه داخلی مخاط معده و دوازدهه ایجاد می‌شوند. PUD یک اختلال شایع گوارشی بوده که شیوع آن در طول عمر یک فرد ۵ تا ۱۰ درصد در جمعیت‌های عمومی است (۱). علت PUD به‌طور کامل مشخص نیست، اما عوامل محیطی و ژنتیکی در بروز آن دخیل هستند. عفونت به هلیکوباکتریلوری و استفاده از داروهای ضد التهابی استروئیدی و غیراستروئیدی (Nnsteroidal Anti-Inflammatory Drugs) دو عامل اصلی در بروز PUD است (۲). هلیکوباکتریلوری یک باکتری گرم منفی و میکروآتروفیل بوده که به‌طور مستقیم با بیماری PUD در انسان ارتباط دارد. مطالعات نشان داده که بیش از ۹۰ درصد افراد مبتلا به PUD دارای عفونت مزمن به هلیکوباکتریلوری هستند (۳ و ۴). هلیکوباکتریلوری پس از اتصال به لایه مناسب اپی‌تلیوم معده، فاکتورهای بیماری‌زا مانند CagA و VacA را آزاد و با رها شدن این فاکتورهای بیماری‌زا، آسیب بافتی رخ می‌دهد. میزبان با تولید کموکاین‌ها، پاسخ ایمنی را آغاز نموده و در نهایت التهاب ایجاد می‌گردد (۵). لیپوپلی ساکاریدهای (LPS) باکتری‌های گرم منفی، عوامل اصلی تحریک‌کننده التهاب بوده که توسط گیرنده‌های میزبان شناسایی و باعث تحریک واکنش‌های ایمنی ذاتی می‌شوند (۶). سلول‌های اپیتلیالی مخاط معده میزبان، اولین خط دفاعی ایمنی ذاتی در برابر عفونت هلیکوباکتریلوری هستند (۷). تنظیم مسیرهای سیگنالینگ ایمنی ذاتی برای شناسایی هلیکوباکتریلوری توسط گیرنده‌های تشخیص الگو (Pattern Recognition Receptors) انجام شده که یکی از مهم‌ترین آنها Toll-like receptor (TLRs) می‌باشند (۸). TLRها، مولکول‌های ساختاری محافظت شده باکتری‌ها را شناسایی و به‌عنوان یک الگوی مولکولی به سیستم ایمنی ذاتی ارایه می‌نمایند. این گیرنده‌ها نقش مهمی به‌عنوان یک عامل هشداردهنده در تشخیص عفونت هلیکوباکتریلوری در سیستم ایمنی دارند. در خانواده TLRها، TLR4 نقش مهمی در شناسایی هلیکوباکتریلوری دارد (۸ و ۹). TLR4های بیان شده در اپی‌تلیوم معده، توسط لیپوپلی ساکاریدهای هلیکوباکتریلوری فعال و پاسخ‌های ایمنی ذاتی را بر علیه آن تنظیم می‌نمایند (۱۰). جهش‌های عملکردی TLR4 باعث کاهش شناسایی باکتری، کاهش فعال‌سازی فاکتور NF-kB (Nuclear Factor kappa B) درون سلولی و کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی مختلف گشته و فرد را مستعد ابتلا به بیماری می‌نماید (۱۱). ژن TLR4 بر روی کروموزوم شماره ۹ (q32-33) قرار داشته و متعلق به زیرخانواده TLRهای سطح سلولی است. دو پلی‌مورفیسم rs4986790 و

rs4986791 بالاترین فراوانی تغییرات تک نوکلئوتیدی را در ژن TLR4 داشته که بر دامنه خارج سلولی TLR4 تأثیر گذاشته و باعث اختلال در عملکرد اتصال به لیگاند می‌شوند. پلی‌مورفیسم rs4986790، با یک جابجایی گوانین (G) به آدنین (A) در نوکلئوتید ۸۹۶ (Asp299Gly) و پلی‌مورفیسم rs4986791 با یک جابجایی تیمین (T) به سیتوزین (C) در نوکلئوتید ۱۱۹۶ (Thr399Ile) مشخص می‌شود (۱۲ و ۱۳). با توجه به اهمیت بیماری زخم پپتیک به‌عنوان یک بیماری شایع گوارشی و چند عاملی بودن آن، همچنین نقش مهم TLR4 در تشخیص هلیکوباکتریلوری (عامل اصلی بیماری زخم پپتیک) توسط سیستم ایمنی ذاتی، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط دو پلی‌مورفیسم عملکردی (rs4986790 و rs4986791) ژن TLR4 با زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری در جمعیت استان گیلان از شمال ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۷ بیمار مبتلا به زخم پپتیک دارای عفونت هلیکوباکتریلوری و ۱۲۳ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌های بیماران و گروه شاهد پس از تشخیص اولیه توسط پزشک فوق تخصص گوارش در طی آندوسکوپی و نتیجه پاتولوژی جمع‌آوری شدند. فرم رضایت‌نامه آگاهانه برای شرکت در مطالعه از همه بیماران بر اساس اعلامیه هلسینکی در مورد استفاده از نمونه‌های انسانی (ویرایش ۲۰۱۳) و کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی اخذ شد. حجم تعداد نمونه‌ها بر اساس جدول نمونه‌گیری مورگان به‌دست آمد (۱۴). گروه بیمار، افراد مبتلا به زخم پپتیک همراه با عفونت هلیکوباکتریلوری و گروه کنترل نیز از بین داوطلبان سالم در محدوده سنی و جغرافیایی بیماران بدون عفونت به هلیکوباکتریلوری و زخم پپتیک در خود و سایر بستگان درجه یک خود انتخاب شدند. افراد مبتلا به سایر بیماری‌های معده مانند گاستریت از مطالعه حذف شدند. تمامی افراد اعم از بیماران و گروه شاهد، بومی و ساکن استان گیلان (شمال ایران) بوده و افراد غیر بومی نیز از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های بیوپسی در لوله‌های استریل ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری و به آزمایشگاه ژنتیک ارسال و برای انجام مطالعات مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و خالص‌سازی DNA تام سلولی، از نمونه‌های بیوپسی معده با استفاده از کیت محلول GPP استخراج DNA ژنومی بافت (پویا ژن آزما-ایران- کد شناسه محصول PD130-50) طبق دستورالعمل آن انجام شد. DNA کل استخراج شده تحت آنالیز کمی (اسپکتروفتومتری) و کیفی (الکتروفورز ژل آگارز ۱٪) قرار گرفت.

۱۲/۵μl مسترمیکس 2X Red mastermix حاوی Taq DNA polymerase (آمپلیکون-دانمارک)، ۵/۵ μl آب مقطر استریل تهیه شد. شرایط دمایی PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل Bio rad) بدین صورت تنظیم گردید که واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با برنامه ۹۴°C (۴۵ ثانیه)، دمای اتصال ۶۱°C برای Asp299Gly و ۶۳/۵°C برای Thr399Ile و در نهایت مرحله گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه انجام شد (۱۵). محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و با رنگ آمیزی Safe Stain (یکتا تجهیز- ایران) بر روی دستگاه Gel documentation مشاهده شدند.

نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۷۰°C نگهداری شدند. برای ردیابی هلیکوباکتریلوری از یک جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد. توالی جفت پرایمرها جهت تکثیر DNA در PCR، با نرم افزار Oligo7 (ویرایش ۷/۵۷) طراحی گردید. همچنین ژنوتیپ‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 در بیماران و گروه شاهد با روش Tetra Primer ARMS-PCR تعیین شدند (۱۵). صحت و اختصاصیت پرایمرها در سایت مرجع NCBI مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). واکنش‌های PCR در حجم کل ۲۵ μl، حاوی ۳۰ ng DNA، هر کدام از پرایمرها ۰/۱ pMol (TAG کپنهاگ- دانمارک)،

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی هلیکوباکتریلوری و تشخیص پلیمورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 (۱۵)

Title	Nucleotide sequence	Products Size	Reference
H.pylori	5'- AGG ATGCGTCAGTCGCAAGAT -3/ 5'- CCTGTGGATAAGACAGGCCAGT -3' F Outer: 5'-TGAACCTATGAACCTTATCC- 3' R Outer: 5'-GTAACTAATTCTAAATGTTGCCA TC -3'	305-bp	-
rs498679	F Inner: 5'- GCATACTTAGACTACCTCGAAGA -3' R Inner: 5'- CAAACAATTAAATAAGTCAATAC -3' F Outer: 5'-AGGCTTACTTTCCTTCCAAACAAAGGT G-3' R Outer: 5'-TGAAAGCAACTCTGGTGT GAGTATGAG A-3'	Outers: 385-bp A Allele: 147-bp G Allele: 292-bp	15
rs4986791	F Inner: 5'-TGTTCCTCAAAGTGATTTT GGGACCAC -3' R Inner: 5'-TGAAGCTCAGATCTAAAT ACTTTAGGCGGA -3'	Outers: 326-bp C Allele: 177-bp T Allele: 227-bp	15

(کنترل)، ۲۲۷ جفت باز (آل T) و ۱۷۷ جفت باز (آل C) از ژن TLR4 در هر دو گروه تکثیر شدند (شکل ۲). در نهایت برای صحت ژنوتایپینگ، ۱۵٪ از نمونه‌ها به‌طور تصادفی انتخاب و مجدداً تعیین ژنوتیپ (توالی‌یابی) شدند.

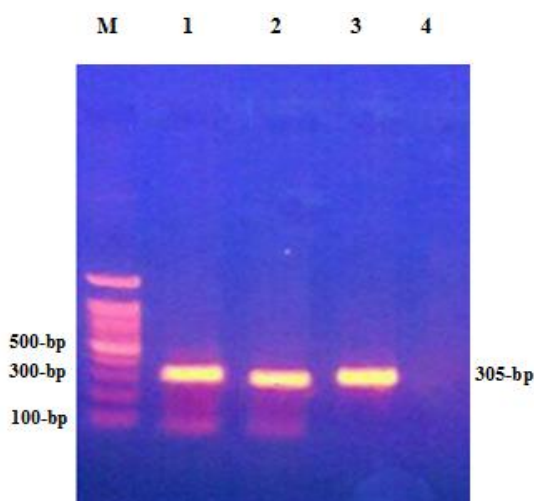
در این تحقیق از نرم افزار SPSS برای تفسیر نتایج به‌دست آمده از آزمایشات ژنتیک مولکولی استفاده شد. تفاوت در فراوانی ژنوتیپی و آلی در هر دو گروه بیمار و کنترل با تجزیه و تحلیل مجذور کای (χ^2) انجام شد. در تجزیه و تحلیل آماری، $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری برای ژنوتیپ‌های دو گروه در نظر گرفته شد. در نهایت، نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد (CI) نیز محاسبه شد.

نتایج

در این مطالعه ۲۳۰ نفر مورد بررسی قرار گرفتند. گروه بیمار و کنترل از نظر سن و جنس همسان بودند. محدوده سنی بیماران مبتلا به PUD، ۲۵ تا ۶۹ سال با میانگین سنی $47/3 \pm 37/3$ و گروه شاهد ۱۹ تا ۷۲ سال با میانگین سنی $46/4 \pm 32/6$ بود. در گروه بیمار ۶۱ نفر (۵۷٪) زن و ۴۶ نفر (۴۳٪) مرد و در گروه شاهد ۶۷ نفر (۵۴/۵٪) مرد و ۵۶ نفر (۴۵/۵٪) زن بودند. بر اساس اطلاعات پرسش‌نامه‌ها، تفاوت معناداری از نظر سن و جنس بین دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد ($P=0/3$).

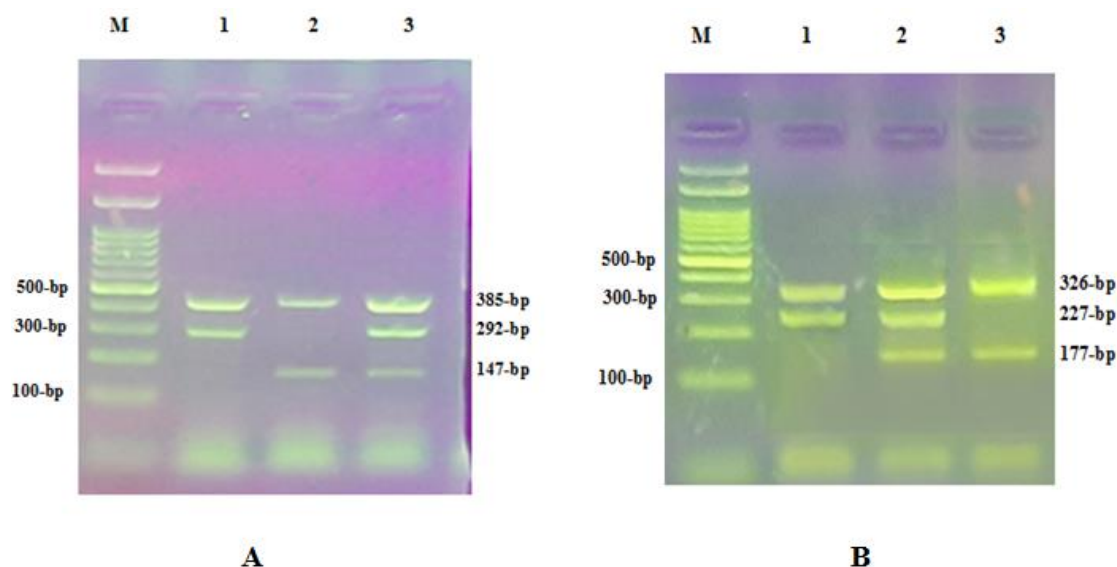
برای تأیید حضور هلیکوباکتریلوری در نمونه‌های بیماران، از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه‌ای به‌طول ۳۰۵ جفت باز از ژن rRNA S ۲۳ در کنترل مثبت (برای دقت آزمایش) استفاده شد (شکل ۱).

همچنین برای تعیین ژنوتیپ‌های جایگاه rs4986790، قطعاتی با طول‌های ۲۸۵ جفت باز (شاهد)، ۲۹۲ جفت باز (آل G) و ۱۴۷ جفت باز (آل A) و جایگاه rs4986791، قطعاتی با طول‌های ۳۲۶ جفت باز



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ محصولات PCR جهت شناسایی هلیکوباکتریلوری

چاهک M مربوط به مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱، ۲ و ۳ قطعه ۳۰۵ جفت باز که نشان‌دهنده وجود هلیکوباکتریلوری و چاهک ۴ نشان‌دهنده عدم وجود باکتری (کنترل منفی) می‌باشد.



شکل ۲- ژل آگارز ۲٪ مربوط به محصولات PCR برای تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم های rs4986790 (A) و rs4986791 (B)

تصویر A: چاهک M، مربوط به مارکر ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱ قطعات ۳۸۵ و ۲۹۲ جفت باز مربوط به ژنوتیپ GG، چاهک ۲ قطعات ۳۸۵ و ۱۴۷ جفت باز مربوط به ژنوتیپ AA و چاهک ۳ قطعات ۳۸۵ و ۱۴۷، ۲۹۲ جفت باز مربوط به ژنوتیپ AG، تصویر B: چاهک M، مربوط به مارکر ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱ قطعات ۳۲۶ و ۲۲۷ جفت باز مربوط به ژنوتیپ TT، چاهک ۲ قطعات ۳۲۶ و ۱۷۷ جفت باز مربوط به ژنوتیپ CT و چاهک ۳ قطعات ۳۲۶ و ۱۷۷ جفت باز مربوط به ژنوتیپ CC.

جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 در بیماران و گروه کنترل

		بیماران (N=۱۰۷ (%))	کنترل (N=۱۲۳ (%))	OR(95%CI)	P.V
rs4986790	AA	۳۲ (%۲۹/۹)	۶۴ (%۵۲)	Ref	-
	AG	۵۱ (%۴۷/۶)	۴۷ (%۳۸/۲)	۱/۴۵ (۱/۱۰-۱/۹۱)	۰/۰۰۸
	GG	۲۴ (%۲۲/۴)	۱۲ (%۹/۷)	۲/۷۱ (۱/۴۸-۴/۹۵)	۰/۰۰۱
	AG+GG	۷۵ (%۷۰/۱)	۵۹ (%۴۷/۹)	۱/۴۶ (۱/۱۷-۱/۸۲)	۰/۰۰۱
	A	۱۱۵ (%۵۳/۷)	۱۷۵ (%۷۱/۱)	Ref	-
rs4986791	G	۹۹ (%۴۶/۳)	۷۱ (%۲۸/۸)	۱/۶۰ (۱/۲۵-۲/۰۴)	۰/۰۰۰۱
	CC	۴۲ (%۳۹/۲)	۷۱ (%۵۷/۷)	Ref	-
	CT	۴۸ (%۴۴/۸)	۴۴ (%۳۵/۷)	۱/۳۹ (۱/۰۳-۱/۸۸)	۰/۰۰۳
	TT	۱۷ (%۱۵/۹)	۸ (%۶/۵)	۲/۸۴ (۱/۳۱-۶/۱۴)	۰/۰۰۵
	CT+TT	۶۵ (%۶۰/۷)	۵۲ (%۴۲/۲)	۱/۴۳ (۱/۱۱-۱/۸۵)	۰/۰۰۵
	C	۱۳۲ (%۶۱/۶)	۱۸۶ (%۷۵/۶)	Ref	-
	T	۸۲ (%۳۸/۳)	۶۰ (%۲۴/۳)	۱/۵۷ (۱/۱۹-۲/۰۷)	۰/۰۰۱

آللی، فراوانی آلل T جهش یافته در بیماران ۳۸/۳٪ و در گروه کنترل ۲۴/۳٪ بود. با توجه به مقدار χ^2 ، تفاوت آماری معنی داری در فراوانی آللی در دو گروه مشاهده شد ($\chi^2=۱۰/۴۰$ ، $P=۰/۰۰۱$ ، $P=۰/۰۰۱$ ، $P=۰/۰۰۱$). با توجه به تفاوت معنی دار فراوانی ژنوتیپ های GG (rs4986790) و TT (rs4986791) و فراوانی آلل های G و T، وجود این دو آلل در دو محل فوق می تواند به عنوان یک عامل خطر احتمالی برای پیشرفت بیماری و عفونت به هلیکوباکتریلوری در نظر گرفته شود. همچنین می توان ژنوتیپ های AA و CC در دو جایگاه ژن TLR4 را به عنوان یک عامل محافظتی برای کاهش خطر ابتلا به بیماری و عفونت به هلیکوباکتریلوری مطرح نمود.

با توجه به نتایج به دست آمده، برای پلی مورفیسم rs4986790، فراوانی ژنوتیپ GG در بیماران بیشتر از افراد سالم بود. بر اساس آزمون Chi-Square، تفاوت آماری معنی داری در ژنوتیپ GG بین دو گروه مورد مطالعه مشاهده شد. بر اساس نتایج مشاهده شده افراد با ژنوتیپ GG، ۲/۷ برابر بیشتر مستعد ابتلا به زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری بودند ($\chi^2=۱۱/۹۱$ ، $P=۰/۰۰۱$ ، $OR=۲/۷۱$ ، $CI=۱/۴۸-۴/۹۵$). از نظر فراوانی آللی نیز، فراوانی آلل G در بیماران به طور معنی داری بیشتر از گروه سالم بود ($\chi^2=۱۴/۸۷$ ، $P=۰/۰۰۰۱$ ، $OR=۱/۶۰$ ، $CI=۱/۲۵-۲/۰۴$). برای پلی مورفیسم rs4986791 نیز تفاوت آماری معنی داری در ژنوتیپ TT بین دو گروه مورد مطالعه مشاهده شد ($\chi^2=۷/۹۵$ ، $P=۰/۰۰۵$ ، $OR=۲/۸۴$ ، $CI=۱/۳۱-۶/۱۴$). از نظر فراوانی

بحث

PUD از شایع‌ترین آسیب‌های معده در جمعیت‌های عمومی جهان بوده و علت اصلی بروز این بیماری حضور و تکثیر هلیکوباکتریلوری می‌باشد. مشخص شده TLRها نقش بسیار مهمی در شناسایی عوامل بیماری‌زا، تنظیم و فعال کردن سیستم ایمنی ذاتی دارند. اگرچه مکانیسم ایمنی ناشی از هلیکوباکتریلوری از طریق مسیر سیگنالینگ TLRها به‌طور کامل شناخته نشده است اما نتایج مطالعات نشان داده که پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی مختلف در ژن‌های گیرنده سیستم ایمنی بر پاسخ میزبان به هلیکوباکتریلوری تأثیر گذاشته و به‌عنوان یک عامل خطر در ایجاد تغییرات معده نقش دارند (۱۶ و ۱۷). این مطالعه با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 با زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری بر روی ۲۳۰ نمونه در جمعیت استان گیلان از شمال ایران انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین پلی‌مورفیسم‌های مورد نظر (از نظر فراوانی ژنوتیپی و آللی) با زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری در جمعیت مورد مطالعه رابطه معنی‌داری وجود دارد. با توجه به اختلاف آماری معنی‌دار در فراوانی ژنوتیپ‌های GG (rs4986790) و TT (rs4986791) و فراوانی آلل‌های G و T بین گروه بیمار و کنترل، وجود این دو آلل در دو محل می‌تواند به‌عنوان یک عامل خطر برای پیشرفت بیماری و عفونت به هلیکوباکتریلوری در نظر گرفته شود. همچنین ژنوتیپ‌های AA و CC به‌عنوان یک عامل محافظتی در برابر بیماری و کاهش خطر ابتلا به بیماری و عفونت به هلیکوباکتریلوری مطرح می‌باشند. مطالعات قبلی نشان داده که این دو تغییر تک نوکلئوتیدی در اگزون شماره سه ژن TLR4 ایجاد شده و باعث اختلال در عملکرد دامنه خارج سلولی گیرنده TLR4 (محل اتصال گیرنده-لیگاند) می‌گردند (۱۸). جعفرزاده و همکاران در جمعیت کرمان به ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های TLR4 و TLR2 با زخم پپتیک و عفونت سویه‌های هلیکوباکتریلوری CagA+ پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که بین پلی‌مورفیسم rs4986790 ژن TLR4 با بیماری زخم معده و سویه‌های هلیکوباکتریلوری CagA+ ارتباط معناداری وجود ندارد و حضور آلل G در این جایگاه یک فاکتور خطر احتمالی برای بیماری و عفونت در آن جمعیت مطرح نمی‌باشد (۱۹). در مطالعه‌ای ملیت و همکاران در سال ۲۰۱۹، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 و کودکان مبتلا به گاستریت همراه با عفونت هلیکوباکتریلوری را مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش دادند که ارتباط معناداری بین این دو پلی‌مورفیسم و عفونت هلیکوباکتریلوری در کودکان مبتلا به گاستریت وجود ندارد. اما ارتباط معناداری بین

پلی‌مورفیسم‌های فوق و عفونت هلیکوباکتریلوری در افراد دارای وضعیت اجتماعی پایین مشاهده کردند (۱۸). اصغری و همکاران در جمعیت ایران به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 با خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ پرداختند. آنها نشان دادند که هیچ ارتباط معناداری بین این دو پلی‌مورفیسم با افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ در جمعیت ایران وجود ندارد (۲۰). اختلاف این نتایج با مطالعه ما شاید به علت تفاوت در نژاد و تنوع مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با بیماری باشد. همچنین، شاید سبک زندگی یا وضعیت اجتماعی و اقتصادی افراد در بروز عفونت تأثیر گذار باشد. در یک مطالعه متاآنالیز که توسط وانگ و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام گرفت، آنها گزارش دادند که بین دو پلی‌مورفیسم rs4986790 و rs4986791 در ژن TLR4 و استعداد ابتلا به سرطان معده رابطه معناداری وجود دارد. آنها گزارش دادند که افراد دارای آلل G در rs4986790 و آلل T در rs4986791 در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان معده هستند (۲۱). در مطالعه‌ای مشابه، باقری و همکاران در جمعیت شهرکرد به ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs4986790 با بیماری گاستریت معده همراه با عفونت هلیکوباکتریلوری پرداختند. آنها نشان دادند که پلی‌مورفیسم جایگاه rs4986790 واقع در ژن TLR4 با بیماری گاستریت ارتباط داشته و حضور آلل G در این جایگاه یک فاکتور خطر احتمالی برای ابتلا به بیماری گاستریت می‌باشد. همچنین عنوان کردند که حضور آلل G می‌تواند خطر ابتلا به گاستریت مزمن را افزایش دهد (۲۲). در مطالعه مشابه دیگری جیانگ و همکاران گزارش دادند که ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم جایگاه rs4986790 واقع ژن TLR4 و عفونت هلیکوباکتریلوری در جمعیت ژجیانگ چین وجود دارد (۲۳). در مطالعه ما نیز ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم‌های rs4986790 و rs4986791 ژن TLR4 با زخم پپتیک و عفونت هلیکوباکتریلوری مشاهده شد. هم راستا بودن نتایج شاید به دلیل نزدیک بودن جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی باشد. در حالت کلی می‌توان گفت علت نتایج متفاوت مطالعات در فراوانی ژنوتیپی و آللی شاید به دلیل تعداد نمونه و تأثیر احتمالی عوامل مختلف (ژنتیکی و محیطی) بر بیماری و ابتلا به عفونت هلیکوباکتریلوری باشد. در این مطالعه فقط دو تغییر تک نوکلئوتیدی در ژن TLR4 مورد بررسی قرار گرفت. با در نظر گرفتن محدودیت‌های مطالعه ما از جمله کوچک بودن جمعیت مطالعه شده و با توجه به اینکه بیمای زخم پپتیک جزء بیماری‌های چند عاملی است، نیاز به مطالعه بر روی جمعیت‌های بزرگ‌تر و متفاوت‌تر ایران و همچنین سایر ژن‌های سیستم ایمنی بوه تا تأثیر عوامل متفاوت در کنار یکدیگر ارزیابی گردد. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی رایج

5. Tempera P, Michael M, Tageldin O, Hasak S. Gastric cancer due to chronic h. pylori infection: what we know and where we are going. *Diseases* 2022;10:57. doi: 10.3390/diseases10030057
6. Imoto I, Oka S, Katsurahara M, Nakamura M, Yasuma T, Akada J, et al. Helicobacter pylori infection: is there circulating vacuolating cytotoxin A or cytotoxin-associated gene A protein?. *Gut Pathogens* 2022;14:1-7. doi: 10.1186/s13099-022-00519-8.
7. Meliț L, Mărginean C, Mărginean C, Marginean M. The Relationship between Toll-like Receptors and Helicobacter pylori-Related Gastropathies: Still a Controversial Topic. *J Immunol Res* 2019;4:8197048. doi: 10.1155/2019/8197048
8. Zhang X, Zhang K, Yan L, Wang P, Zhao F, Hu S. The role of toll-like receptors in immune tolerance induced by Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2023;28:13020. doi: 10.1111/hel.1302
9. Duan T, Xing Ch, Wang HY, Wang RF. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* 2022;13:812774. doi: 10.3389/fimmu.2022.812774
10. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 2021;78:1233-61. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y
11. Tang X, Yang T, Shen Y, Song X, Benghezal M, Marshal B, et al. Roles of lipopolysaccharide glycosyltransferases in maintenance of helicobacter pylori morphology, cell wall permeability, and antimicrobial susceptibilities. *Int J Mol Sci* 2023;24:11381. doi: 10.3390/ijms241411381
12. Sun M, Jiang H, Meng T, Liu P, Chen H. Association between tlr4 gene polymorphisms and risk of preeclampsia: systematic review and meta-analysis. *Med Sci Monit* 2021;2:930438. doi: 10.12659/MSM.930438
13. Prakasam P, Salam A, Ahamed I. The pathogenic effect of SNPs on structure and function of human TLR4 using a computational approach. *J Biomol Struct Dyn* 2023;41:12387-400. doi: 10.1080/07391102.2023.216699
14. Ahmad H and Halim H. Determining sample size for research activities: the case of organizational research. *Selangor Business Review* 2021;2:20-34.
15. Miri-Moghaddam E, Farhad-Mollashahi N, Baghaee E, Bazi A, Garne Y. Role of Thr399Ile and Asp299Gly polymorphisms of toll-like receptor-4 gene in acute dental abscess. *J Clin Exp Dent* 2017;9:196-201. doi: 10.4317/jced.53190
16. Peiffer S, Pelton M, Keeney L, Kwon EG, Ofosu-Okromah R, Acharya Y, et al. Risk factors of perioperative mortality from complicated peptic ulcer disease in Africa: systematic review and meta-Analysis. *BMJ Open Gastro* 2020;7:000350. doi: 10.1136/bmjgast-2019-000350
17. Fan J, Zhu J, Xu H. Strategies of Helicobacter pylori in evading host innate and adaptive immunity: insights and prospects for therapeutic targeting. *Front Cell Infect Microbiol* 2024;14:1342913. doi: 10.3389/fcimb.2024.1342913
18. Meliț L, Mărginean C, Bănescu C, Bogli A, Mocan S, Iancu M. The relationship between TLR4 rs4986790 and rs4986791 gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection in children with gastritis. *Pathol Res Pract* 2019;215:152692. doi: 10.1016/j.prp.2019.152692
19. Mirkamandar E, Nemati M, Hayatbakhsh MM, Bassagh A, Khosravimashizi A, Jafarzadeh A. Association of a single nucleotide polymorphism in the TLR2 gene (rs3804099), but not in the TLR4 gene (rs4986790), with Helicobacter pylori infection and peptic ulcer. *Turk J Gastroenterol* 2018;29:283-91. doi: 10.5152/tjg.2018.17484
20. Asghari A, Nowras T, Tavakoli T, Fakharian T, Emadian Razavi F, Soltaninejad E, Naseri M. Association between rs4986790 and rs4986791 Polymorphisms in TLR4 with Colorectal Cancer Risk in Iranian Population. *Human Genetic* 2021;57:740-4. doi: 10.1134/S1022795421060028

ترین نوع جهش ژنتیکی در ژنوم انسان هستند. شناسایی این تغییرات تک نوکلئوتیدی می‌تواند درک ما را نسبت به شناخت مسیرهای مولکولی بیشتر نموده و همچنین می‌تواند به عنوان نشانگرهای بیولوژیکی مهم برای تشخیص و پیشگیری و حتی درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی می‌باشد. از حمایت پژوهش و تحصیلات تکمیلی و پرسنل آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن و از تمام پزشکان و پرسنل مراکز آندوسکوپی بیمارستان‌ها و در نهایت از کلیه بیماران و افراد سالم شرکت‌کننده در این پژوهش سپاس‌گزاری می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق در پزشکی پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با شناسه IR.IAU.TON.REC.1398.008 انجام شد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافع در پژوهش حاضر وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

سیده طناز کمونه: جمع‌آوری نمونه‌ها و انجام آزمایش‌ها، رسول زحمتکش رودسری: طراحی پژوهش، تجزیه و تحلیل داده‌های آماری، نگارش و ویرایش مقاله. در نهایت مقاله توسط هر دو نویسنده خوانده و تأیید شده است.

حمایت مالی

این مطالعه حامی مالی نداشت.

کد اخلاق

این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق در پزشکی پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با شناسه IR.IAU.TON.REC.1398.008 انجام شد.

References

1. Xie X, Ren K, Zhou Z, Dang C, Zhang H. The global, regional and national burden of peptic ulcer disease from 1990 to 2019: a population-based study. *BMC Gastroenterol* 2022;10:58. doi: 10.1186/s12876-022-02130-2
2. Majumdar D, Looi S. Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. *Medicine* 2024;52:152-60. doi: 10.1016/j.mpmed.2023.12.006
3. Gupta A, Shetty S, Mutalik S, Chandrashekar R, Nandakumar K, Mathew E, et al. Treatment of H. pylori infection and gastric ulcer: Need for novel Pharmaceutical formulation. *Heliyon* 2023;9:20406. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e20406
4. Ali A, Alhussaini K. Helicobacter pylori: A contemporary perspective on pathogenesis, diagnosis and treatment strategies. *Microorganisms* 2024;12:222. doi: 10.3390/microorganisms12010222

21. Wang F, Wen X, Wen T, Liu Z. Association of TLR4 gene 2026A/G (rs1927914), 896A/G (rs4986790), and 1196C/T (rs4986791) polymorphisms and cancer susceptibility Meta-analysis and trial sequential analysis. *Medicine* 2023;102:33040. doi: [10.1097/MD.00000000000033040](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000033040)
22. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Sanei H, Taghikhani A, Rahimian Gh, Salimzadeh L, et al. Associations of a TLR4 single-nucleotide polymorphism with H. pylori associated gastric diseases in Iranian patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014;38:366-71. doi: [10.1016/j.clinre.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.clinre.2013.12.004)
23. He W, Jiang M. TLR4 rs4986790 polymorphism confers risk to Helicobacter pylori infection in Zhejiang, China and its enlightenment to nursing care. *J Clin Lab Anal* 2022;36:24453. doi: [10.1002/jcla.24453](https://doi.org/10.1002/jcla.24453)



Association of TLR4 rs4986790 and rs4986791 Gene Polymorphisms with Risk of Peptic Ulcer and H.Pylori Infection in Guilan Province Population

Seyedeh Tannaz Kamooneh (M.Sc.)¹, Rasoul Zahmatkesh Roodsari (Ph.D.)^{1*}

1- Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Received: 21 October 2024, Accepted: 2 March 2025

Abstract:

Introduction: Peptic ulcer is one of the most common gastrointestinal diseases in humans. *Helicobacter pylori* infection is a major cause of peptic ulcers. Toll-like receptors (TLRs) regulate innate immune signaling pathways by recognizing specific bacterial components. TLR4, in particular, activates immune responses against pathogens by recognizing lipopolysaccharides. This study investigated the effects of TLR4 rs4986790 and rs4986791 polymorphisms on susceptibility to peptic ulcers and *Helicobacter pylori* infection.

Methods: In this case-control study, 107 patients with peptic ulcers and 123 healthy individuals were evaluated. Genomic DNA was extracted, and the genotypic frequencies in patient and control groups were analyzed using the Tetra-primer ARMS-PCR method. Data analysis was performed using SPSS software.

Results: Based on the results, there is a statistically significant difference between the frequency of the GG genotype ($\chi^2=11.91$, $P=0.001$, $CI=1.48-4.95$, $OR=2.71$) and G allele ($\chi^2=14.87$, $P=0.0001$, $CI=1.25-2.04$, $OR=1.60$) at the rs4986790 position and the frequency of the TT genotype ($\chi^2=7.95$, $P=0.005$, $CI=1.31-6.14$, $OR=2.84$) and T allele ($\chi^2=10.40$, $P=0.001$, $CI=1.19-2.07$, $OR=1.57$) was observed at rs4986791 position of TLR4 gene with peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection among the patient and control groups.

Conclusion: Statistical analysis revealed that the G and T alleles in the TLR4 gene may serve as potential risk factors for peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection. However, further studies involving larger and more diverse populations are necessary to validate these findings.

Keyword: Polymorphism, Peptic ulcer, TLR4 gene, *Helicobacter pylori*.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: R. Zahmatkesh Roodsari, Email: zahmatkesh.rasoul@gmail.com

Citation: Kamooneh S.T, Zahmatkesh Roodsari R. Association of TLR4 rs4986790 and rs4986791 gene polymorphisms with risk of peptic ulcer and H.pylori infection in Guilan province population. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(1):2-9.

