

Original Article

The Determination of ω - Fatty Acids (PUFAs) Effect on *caspase-8* gene expression of stomach in patients infected with *H. pylori*

Rasoul Sharifi¹, Mohammad Nouri^{2*}, Homayun Dolatkah², Masoud Shirmohammadi³

¹Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

²Department of Clinical Biochemistry and Laboratories Medicine, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Digestive and Liver Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: nourimd@yahoo.com

Received: 21 February 2018 Accepted: 14 March 2018 First Published online: 19 May 2020

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 June- July; 42(2):184-193

Abstract

Background: Drug-resistant strains and poor treatment response is the main reason for the failure in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication. Unsaturated fatty acids with more than one double bond (PUFAs) have inhibitory effect on bacterial growth. Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of Omega fatty acids on caspase-8 gene expression in *H. pylori* infected patients with dyspeptic symptoms.

Methods: In this double blind clinical trial study in which 34 *H. pylori* infected patients with dyspeptic symptoms were randomly divided into two groups of 17 patients, the control group receiving standard triple therapy (including amoxicillin, clarithromycin and omeprazole) and the intervention group receiving standard therapy with omega-3, omega-6 and omega-9 fatty acids for two weeks. After treatment, Gene expression levels of *Caspase-8* enzymes as well as the semi-quantitative of these proteins were studied with PCR Real-time method and frozen section and immunohistochemistry, respectively.

Results: In the case group compared with the control group, a significant increasing in the expression of *caspase-8* genes was observed ($p=0.002$). The protein level of active caspase -8 enzymes was significantly increased in the case group compared with the control group (0.004).

Conclusion: The Omega fatty acids along with standard triple therapy lead induce apoptosis is stomach.

Keyword: *H. Pylori*, Unsaturated Fatty Acids, Caspase-8, Stomach

How to cite this article: Sharifi R, Nouri M, Dolatkah H, Shirmohammadi M. [The Determination of ω - Fatty Acids (PUFAs) Effect on caspase-8 gene expression of stomach in patients infected with *H. pylori*]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 June- July; 42(2):184-193. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر اسیدهای چرب غیر اشباع امگا بر بیان کاسپاز-۸ بافت معده در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری

رسول شریفی^۱، محمد نوری^{۲*}، همایون دولتخواه^۳، مسعود شیر محمدی^۳

^۱ گروه زیست شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
^۲ گروه بیوشیمی بالینی و آزمایشگاه های بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسوول: ایمیل: nourimd@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۲/۳۰
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۹؛ ۴۲(۲): ۱۸۴-۱۹۳

چکیده

زمینه: سویه های مقاوم به دارو و پاسخ نامناسب به درمان، علت اصلی ناکارآمدی در ریشه کن سازی هلیکوباکتر پیلوری است. اسیدهای چرب غیر اشباع با بیش از یک پیوند دوگانه، تأثیر مهاری بر رشد باکتری دارند. لذا مطالعه حاضر به تأثیر اسیدهای چرب امگا بر بیان کاسپازها در معده بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با علائم دیسپپتیک پرداخته است.

روش کار: در مطالعه کارآزمایی بالینی دوسوکور، ۳۴ بیمار آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با علائم دیسپپتیک بطور تصادفی به دو گروه ۱۷ نفره، گروه کنترل دریافت کننده درمان استاندارد سه گانه (شامل آموکسیسیلین، کلاریترومایسین و امپرازول) و گروه مورد دریافت کننده درمان استاندارد همراه با اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و امگا-۹ به مدت دو هفته، تقسیم گردیدند. پس از پایان دوره درمان، میزان بیان ژن آنزیم کاسپاز-۸ به روش Real-Time PCR و میزان نیمه کمی این پروتئین به روش برش انجمادی و ایمنوهیستوشیمی بررسی گردید. بدلیل مستقل بودن گروه های مورد مطالعه، میانگین نتایج بدست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه و توسط آزمون Independent Sample t-Test و من-ویتنی در دو گروه مقایسه شدند ($p < 0/05$).

یافته: در گروه مورد در مقایسه با کنترل، بیان ژن کاسپاز-۸ افزایش معنادار ($p = 0/002$) را نشان داد ($p = 0/08$). همچنین میزان درصد پروتئین آنزیم کاسپاز-۸ افزایش معناداری در گروه مورد نسبت به کنترل نشان داد ($p = 0/004$).

نتیجه گیری: می توان بیان کرد که اسیدهای چرب امگا همراه با درمان استاندارد سه گانه، سبب القای آپوپتوز در بافت معده می شود.

کلید واژه ها: هلیکوباکتر پیلوری، اسیدهای چرب غیر اشباع، کاسپاز-۸، معده

نحوه استناد به این مقاله: شریفی ر، نوری م، دولتخواه ه، شیر محمدی م. تعیین تأثیر اسیدهای چرب غیر اشباع امگا بر بیان کاسپاز-۸ بافت معده در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۲): ۱۸۴-۱۹۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

معده در معرض حمله پاتوژن های مختلف از جمله انواع باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها است (۱). یکی از این باکتری ها که درصد بسیار بالایی از آلودگی های میکروبی بافت معده را تشکیل می دهد، هلیکوباکتر پیلوری می باشد. هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی، تک قطبی، مولتی فلاژل، میکروآئروفیل، با باسیل های خمیده می باشد که باعث گاستریت حاد و مزمن، زخم دوازدهه و سرطان معده در انسان می شود. گاستریت ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری شیوع نسبتا بالایی داشته و حدود ۱۰ درصد مردم در طول عمر خود از بیماری گاستریت رنج می برند. شیوع آن در مردان کمی بیشتر از زنان است (۵-۲). در سراسر جهان شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری، با بالا رفتن سن، افزایش یافته و در میان بزرگسالان در کشورهای با فقر بهداشت ۷۰ الی ۹۰٪ برآورد شده است (۶). حضور هلیکوباکتر پیلوری در زخم های دستگاه گوارشی منجر به تغییرات بسیار وسیعی در بافت های مختلف و تغییر سیگنال آنها می شود. با این حال هلیکوباکتر پیلوری تنها میکروارگانیسمی نیست که باعث التهاب و زخم معده در انسان می شود (۱۸). با کاهش اسیدیته معده در نتیجه استقرار هلیکوباکتر پیلوری و یا در نتیجه استفاده از داروهای آنتی اسید، این فرصت پیش خواهد آمد که سایر پاتوژن ها نیز به بافت معده حمله کرده و باعث التهاب معده شوند (۹). به همین خاطر در سال های اخیر، به تعامل بین هلیکوباکتر پیلوری و سایر باکتری ها در ایجاد التهاب معده و عوارض ناشی از آن علاقه شدیدی پیدا شده است تا بتوان راه های درمانی موثرتری برای درمان این اختلال و جلوگیری از تشکیل سرطان معده ارایه نمود (۱۰). بنابراین روشن کردن مکانیسم مولکولی این اختلال و راه های پیشگیری از آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری و سایر میکروفلورهای معده نقش بسیار مهمی در ابداع روش های پیشگیری و درمان موثر التهاب و گاستریت، بازی می کند. هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک کارسینوژن در تغییر فرایند آپوپتوز در سلول میزبان تاثیر دارد. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلول می باشد که در تنظیم رشد، نمو و پاسخ ایمنی و پاکسازی سلول های غیر طبیعی نقش بسیار مهمی داشته (۱۱) و فعال سازی مکانیسم آن در جلوگیری از شکل گیری روند ایجاد بدخیمی ها ضروری می باشد (۱۲). در میان مولکول های القا کننده آپوپتوز، سیستم آبشار پیام رسانی کاسپاز مهم است (۱۳). کاسپازها در واقع پروتئاز سیستمین-آسپاراتات می باشند که فعال شدن آنها از مسیرهای زیادی امکان پذیر است ولی دو مسیر با جزئیات بیشتری مورد بررسی قرار گرفته است: مسیر خارجی آپوپتوز یا مسیر وابسته به گیرنده های مرگ و مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی. مطالعات نشان داده اند که کاسپاز ۸ در مسیر خارجی و کاسپاز ۹ در مسیر داخلی به عنوان کاسپازهای محوری عمل می کنند (۱۳). مطالعات مختلفی، تاثیر رژیم غذایی بر

پیشگیری از برخی بیماری ها را مورد بررسی قرار داده اند. در این مطالعات مشخص شده است که اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و امگا-۹ در پیشگیری از ابتلا به سرطان، التهاب و ... اثرات مختلفی را از خود نشان می دهند. کاهش شیوع زخم دئودنال با افزایش دریافت غذایی اسیدهای چرب با بیش از یک پیوند دوگانه (PUFA ها)، وابسته است و منجر به علاقه روز افزون به نقش آنتی باکتریالی PUFA ها شده است (۱۴). علاوه بر این ثابت شده است که غلظت 10^{-4} $2/5 \times$ اسید لینولئیک که یک اسید چرب امگا-۶ است می تواند رشد هلیکوباکتر پیلوری را در *in vitro* مهار کند. این تاثیر مهاری تصور می شود که به وضعیت غیر اشباعی اسید چرب بستگی دارد یعنی به تعداد پیوندهای مضاعف موجود در مولکول اسید چرب (۱۴). با توجه به اینکه، برخی از اسیدهای چرب غیر اشباع، فرایندهای مختلف فیزیولوژیک مثل پاسخ ایمنی و آپوپتوز را تحت تاثیر قرار می دهند، می توانند از اهمیت ویژه ای برخوردار باشند (۱۵). با توجه به جستجویی که در این زمینه انجام شده، موردی از این مطالعه یافت نشد، بنابراین هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تاثیر اسیدهای چرب غیر اشباع امگا بر میزان بیان کاسپاز-۸ می باشد.

روش کار

این مطالعه از نوع کارآزمایی بالینی مداخله ای دو سوکور می باشد که نه پزشک متخصص دستگاه گوارش و نه بیمار از نوع درمان مطلع نبودند. جمعیت هدف آن، افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با علائم دیسپپتیک بود که آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری و وجود گاستریت یا زخم پپتیک فعال با معاینات بالینی و آندوسکوپی توسط پزشک متخصص گوارش تایید گردید. در این مطالعه افراد مبتلا به آندوکارسینوما معده، بیماران دیابتی، بیماران با اختلالات کلیوی، افراد سیگاری، و بیمارانی که سه ماه قبل از ورود به مطالعه مکمل امگا، ماهی، مواد مخدر و یا داروها و مکمل های دیگری را مصرف کرده باشند، از مطالعه حذف شدند.

از بیماران مراجعه کننده به کلینیک آندوسکوپی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که جهت تشخیص بیماری، تحت آندوسکوپی فوقانی قرار گرفتند، در شرایط ناشتایی ۳ نمونه بیوپسی از آنتروم معده برداشته و به فریزر منتقل و در دمای -70° درجه نگهداری شد. تعداد ۳۴ نفر از بیماران در ۲ گروه ۱۷ نفری با رضایتنامه کتبی و با آگاهی کامل از موضوع تحقیق انتخاب شده و در مرحله بعد، درمان این افراد، زیر نظر پزشک متخصص گوارش، آغاز گردید. تخصیص افراد بصورت کاملا تصادفی توسط پژوهشگر و بر حسب قرعه در گروه های مورد یا کنترل انجام شد تا از خطاهای احتمالی و جهت گیری های ناخواسته جلوگیری به عمل آید.

برای محاسبه حجم نمونه با توجه به نوع مطالعه از فرمول $N \geq S^2 (\Sigma \alpha / 2 + \Sigma \beta) / \delta^2$ استفاده شد. که در این فرمول با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵٪ و توان ۸۰٪ و با توجه به مطالعات قبلی، میانگین بدست آمده برای میزان بیان آنزیم کاسپاز-۳ که یکی از آنزیم‌های مهم برای القاء آپوپتوز می‌باشد، در نظر گرفته شد. در اینصورت حجم نمونه‌ای که از این فرمول بدست آمد، بدین قرار بود:

$$\begin{aligned} S &= 0.01 \\ \alpha &= 0.05 \\ \beta &= 0.2 \\ \xi_{\alpha/2} &= \xi_{1-\alpha/2} = 1.96 \\ \xi_{\beta} &= \xi_{1-\beta} = 0.85 \\ \Delta &= 0.05 \\ N &\geq 0.01(1.16+0.85)^2 / (0.05)^2 \rightarrow N \geq 16.16 \end{aligned}$$

به همین دلیل حجم نمونه برای هر گروه به تعداد ۱۷ نمونه انتخاب گردید تا نتایج قابل تعمیم به کل افراد مبتلا به زخم پپتیک فعال آلوده به هلیکوباکتری پیلوری باشد (۱).

برای اطمینان از میزان دقیق درصد اسیدهای چرب موجود در کپسول‌های استفاده شده در این تحقیق که با عنوان تجاری Natural Factors Ultimate-Omega Factors به بیماران تجویز شد، الگوی اسیدهای چرب موجود در این کپسول‌ها تعیین شد.

به منظور خالص سازی نمونه و حذف احتمالی هرگونه افزاینده و نگهدارنده موجود در قرص، ابتدا مقدار $10 \mu\text{l}$ از روغن ماهی در $990 \mu\text{l}$ آب به طور نسبی مخلوط شده و فرایند استخراج لیپید تام با استفاده از پروتوکول Bligh & Dyer به شرح زیر انجام شد (۱۶):

1 ml از نمونه با $3/75 \text{ ml}$ از محلول متانول/ کلروفرم با نسبت (۱:۲) به خوبی مخلوط شد و پس از سانتریفوژ، مایع رویی برداشته شده و به لوله دیگری منتقل شد. سپس $1/25 \text{ ml}$ کلروفرم به مایع بدست آمده از مرحله قبل اضافه و به خوبی مخلوط شد. در ادامه، $1/25 \text{ ml}$ آب مقطر به محتویات لوله اضافه و به خوبی مخلوط گردید. محلول سانتریفوژ شد و پس از انجام این مرحله لوله به ۳ فاز مجزای زیرین، آبی و وسطی تقسیم گردید، که فاز زیرین (کلروفرم) که حاوی لیپید تام بود که از محیط برداشته شده و ادامه فرایند بر روی آن انجام گرفت.

پس از استخراج لیپید تام، کلروفرم آن در زیر گاز نیتروژن تبخیر و لوله کاملاً خشک شد و در آخر مجدداً میزان 1 ml کلروفرم خالص به لوله اضافه گردید تا غلظت نهایی $10 \mu\text{l/ml}$ لیپید تام بدست آمد. سپس از این محلول مقدار $100 \mu\text{l}$ برداشته و فرایند ترانس استریفیکاسیون طبق دستور العمل زیر انجام شد: به 100 میکرولیتر از نمونه آماده سازی شده، 2 ml از محلول بنزن/ متانل (۴:۱) حاوی استاندارد داخلی گردید، بنزن مورد استفاده حاوی $50 \mu\text{g/ml}$ استاندارد داخلی تری دکانوات (۰:۱۳) بود. در ادامه، 0.2 ml از استیل کلراید خالص به لوله اضافه گردید و به

قرعه کشی بدین شکل انجام شد که در داخل یک کیسه پارچه‌ای، تعداد ۳۴ عدد توپ پینگ پنگ ریخته شده بود که بر روی ۱۷ مورد از آنها استاندارد تراپی + کپسول امگا و بر روی ۱۷ مورد از آنها نیز فقط استاندارد تراپی نوشته شده بود. هر بیماری که به پزشک مراجعت می‌کرد، یک توپ پینگ پنگ بر می‌داشت و بدین ترتیب گروه بیمار مشخص می‌شد و توپ‌ها پس از انتخاب دور ریخته می‌شد. این کار توسط پژوهشگر و مکلف نمودن بیمار به مداخله توسط پزشک متخصص انجام گرفت. در گروه اول درمان با آنتی بیوتیک‌های متداول بدون تجویز مکمل و گروه دوم درمان با همین آنتی بیوتیک‌ها به همراه قرص Natural Factors North America (SKU 2269) 1200 mg (مکمل اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و امگا-۹) با فرمولاسیون: 400 mg Borage Oil 400 mg Flaxseed Oil 400 mg، روزانه به میزان 3600 میلی گرم (سه قرص 1200 میلی گرمی)، به مدت دو هفته شروع شد. دوره مصرف این آنتی بیوتیک‌ها در منابع مختلف یک هفته، ۱۰ روز، دو هفته و سه هفته می‌باشد ولی زیر نظر پزشک متخصص، دوره درمان دو هفته در نظر گرفته شد. پیگیری مصرف دارو و کپسول امگا توسط پزشک متخصص از طریق تماس تلفنی، صورت گرفت. بعد از این مدت، هماهنگ با پیگیری اجباری درمان، دوباره از این افراد آندوسکوپی به عمل آمده و با برداشت بیوپسی در شرایط ناشتا، ریشه کنی هلیکوباکتری پیلوری و رفع گاستریت مزمن فعال پیگیری شد. دوباره نمونه‌های اخذ شده از بیماران بلافاصله به ظروف آماده شده مانند مرحله قبل منتقل شده و جهت آزمایشات لازم به گروه آموزشی مربوطه انتقال داده شد. لازم به ذکر است که اندازه بیوپسی‌ها $2-5$ میلی متر بود. یک نمونه شیره معده به محیط اوره آز سریع، جهت تشخیص هلیکوباکتری پیلوری منتقل و نمونه دیگر به بخش پاتولوژی جهت وجود هلیکوباکتری پیلوری و نیز وجود گاستریت مزمن فعال که مختص هلیکوباکتری پیلوری است، ارسال شد. در صورتی آلودگی به هلیکوباکتری پیلوری مثبت تلقی شد که هر سه مورد (اوره آز، وجود باکتری در نمونه پاتولوژی و وجود گاستریت مزمن فعال) مثبت شوند. همچنین بیوپسی‌ها، برای ارزیابی بیان ژن کاسپاز-۸ اخذ استفاده شدند. با توجه به منابع موجود، روش استفاده از بیوپسی جهت تشخیص قطعی آلودگی به هلیکوباکتری پیلوری یک روش استاندارد طلائی می‌باشد، لذا از این روش استفاده شد. از طرف دیگر با بررسی بیوپسی معده، می‌توان مواردی را که ممکن است در این مطالعه مداخله‌گر باشند نیز بدین روش، شناسایی و حذف نمود. نمونه‌های اخذ شده تا زمان انجام آزمایشات در فریزر -70 درجه نگهداری شدند. قبل از نمونه گیری از بیماران اطلاعاتی راجع به مشخصات فردی از قبیل سن و جنس، سابقه ابتلا به سایر بیماری‌ها گرفته شد و در چک لیستی که به همین منظور تهیه شده بود، ثبت گردید تا هر دو گروه با همدیگر برابری سازی شوند.

شد. لازم به توضیح است که دمای اتصال برای پرایمرها بصورت گرادینانت دمایی بین ۵۴ تا ۶۴ درجه سانتی گراد بود. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل ۱ تا ۲ درصد آگارز بررسی شدند و نتایج آن که بصورت تک باند شارپ در دمای ۵۸/۵ درجه بود، با رنگ آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید و آشکار سازی آن در زیر نور UV مشاهده و ثبت گردید (شکل ۱- قسمت ب). در این مطالعه، برای انجام واکنش Real time PCR از دستگاه SYBER-Green 6000 Corbet Rotor gene و ترکیب تشخیصی SYBER-Green محصول شرکت تجاری TakaRa استفاده شد. پس از پایان واکنش و تعیین خط آستانه، سیکل آستانه (CT) هر نمونه بدست می آید. از نسبت سیکل آستانه ژن مورد نظر با ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه گردان، می توان میزان بیان نسبی ژن مورد نظر را از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آورد. PCR هر کدام از ژن ها، ۳ بار تکرار شد و بعد از بدست آمدن مقادیر CT، آنالیز انجام شد.

طراحی پرایمرهای Real time با استفاده از پایگاه داده بیوانفورماتیکی NCBI و نرم افزار پرایمر ۳ و oligo7 انجام شد. بعد از انتخاب توالی مربوطه هر ژن در سایت NCBI، این توالی ها بصورت EXON-EXON برای هر پرایمر انتخاب و در نرم افزار PRIMER3 جهت طراحی پرایمر وارد و سپس مشخصات لازم اعم از طول قطعه پرایمر، میزان GC% و ... به نرم افزار داده شد. بعد از ارائه چند پرایمر پیشنهادی از PRIMER3، پرایمر دلخواه انتخاب و با نرم افزار OLIGO7 بار دیگر مشخصات لازم کنترل شد. در صورت تایید مشخصات آن و توالی مربوطه که توسط PRIMER BLAST و NOCLEOTID BLAST تایید شده بود انتخاب شد و جهت ستنز ارسال و از شرکت BIONEER خریداری گردید. توالی پرایمرهای مربوط به هر ژن در جدول ۱ آورده شده است. مقدار نیمه کمی کاسپاز-۸ به روش Frozen Section و ایمونوهیستوشیمی انجام گرفت. بدین منظور یک نمونه بیوپسی بلافاصله به تانک ازت منتقل و در آزمایشگاه پاتولوژی بعد از آبیگری، نمونه های بافتی منجمد شده توسط میکروتوم Leica 1800 CRYDCUT-سوئیس برش داده شد و سپس برش ایمونوهیستوشیمی رنگ آمیزی گردید. بدین ترتیب که ابتدا مقطع های ۴ میکرونی از بافت ها تهیه شده و سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در بافر سیترات قرار گرفتند. جهت جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی، نمونه ها توسط skim milk بلوکه شده و سپس نمونه ها با آنتی بادی های اولیه مونوکلونال علیه پروتئین کاسپاز-۸ در ۴ درجه سانتیگراد و به مدت یک شب انکوبه شدند. بعد از ۳ بار شستشو با بافر TBST، آنتی بادی ثانویه اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. برای ظهور پروتئین ها از DAB به عنوان سوپسترا و از همتاکسیلین به عنوان counterstain استفاده و از رنگ رودامین برای رنگ آمیزی فلورسنت استفاده شد (۱۷). ابتدا CT های بدست آمده برای هر ژن توسط فرمول ۲

مدت ۱ ساعت در بن ماری جوش قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، محتویات لوله به یک لوله همولیز انتقال داده شد و کربنات پتاسیم ۶٪ به لوله اضافه و سانتریفوژ گردید. فاز رویی بنزن توسط پیت پاستور جدا شده و جهت تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Buck Scientific 61-آمریکا، آماده گردید. دمای بخش های مختلف این دستگاه به این صورت بود: دمای اینجکتور ۲۵۰، دمای انکوباتور ۲۱۰-۱۹۰ و دمای دتکتور ۲۸۰ درجه سانتی گراد. ستون استفاده شده برای این آنالیز، تکنوکروما با ID:TR-CN 100 و قطر خارجی ستون ۰/۲۵ میلی متر و قطر داخلی آن ۰/۲ میکرومتر بود. دو نوع گاز برای این نوع کروماتوگرافی استفاده می شود: گاز هلیم با فشار ۲۷ پاسکال به عنوان فاز مایع و گاز هیدروژن و هوای فشرده که به عنوان سوخت استفاده می شود که به ترتیب فار آنها ۲۱ و ۸ پاسکال بود. در بررسی بیان ژن های مختلف و همچنین اثر تجویز دارویی مورد نظر بر بیان ژن هدف، ابتدا لازم است کل RNA سلول جداسازی شود. با توجه به اینکه RNA مولکولی ناپایدار است، با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس از روی الگوی RNA، cDNA ساخته شد. همچنین قبل از ساخت cDNA لازم است محلول استخراج شده RNA را با آنزیم DNaseI تیمار کرد تا DNA موجود در آن از بین رود. استخراج RNA با استفاده از کیت Total RNA Mini-Preps Kit (Bio Basic Canada Inc. Lot# BS1361-140929) انجام گرفت. پس از استخراج RNA، برای تعیین کیفیت آن، از نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر استفاده شد که نسبت این دو طول موج در بازه بین ۱/۶ تا ۲ نشان دهنده خلوص RNA و نسبت بالاتر از ۲ و پایین تر از ۱/۶ به ترتیب نشانه آلودگی به DNA و پروتئین می باشد. پس از روشن نمودن دستگاه و کالیبر نمودن آن، با ۲ میکرولیتر آب عاری از RNase، میزان جذب را صفر نموده و سپس ۱/۵ میکرولیتر محلول حاوی RNA به دستگاه داده شد و میزان جذب نوری توسط دستگاه خوانده شد. در نمونه های RNA استخراج شده، غلظت RNA بین ۹۵ نانوگرم در میکرولیتر تا ۴۵۰ نانوگرم در میکرولیتر (ng/μl) متغیر بود. همچنین OD نمونه ها بین ۱/۸ تا ۲/۱ بود. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، باندهای ۱۸rRNAs و ۲۸rRNAs در ژل آگارز ۱/۵ در صد مشاهده گردید. برای این کار ۱/۵ میکرولیتر از RNA تیمار شده در ژل ۱/۵ درصد آگارز به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و باندهای مربوطه مشاهده گردید (شکل ۱- قسمت الف).

برای ساخت cDNA، از کیت RevertAidTMFirst strand cDNA synthesis محصول شرکت تجاری Takara استفاده شد. برای اطمینان از کیفیت cDNA ساخته شده، یک واکنش PCR برای ژن خانه گردان *GAPDH* انجام شد. در این واکنش، به عنوان الگو از cDNA ساخته شده و از DNA پلیمرز *SmartTaq* استفاده

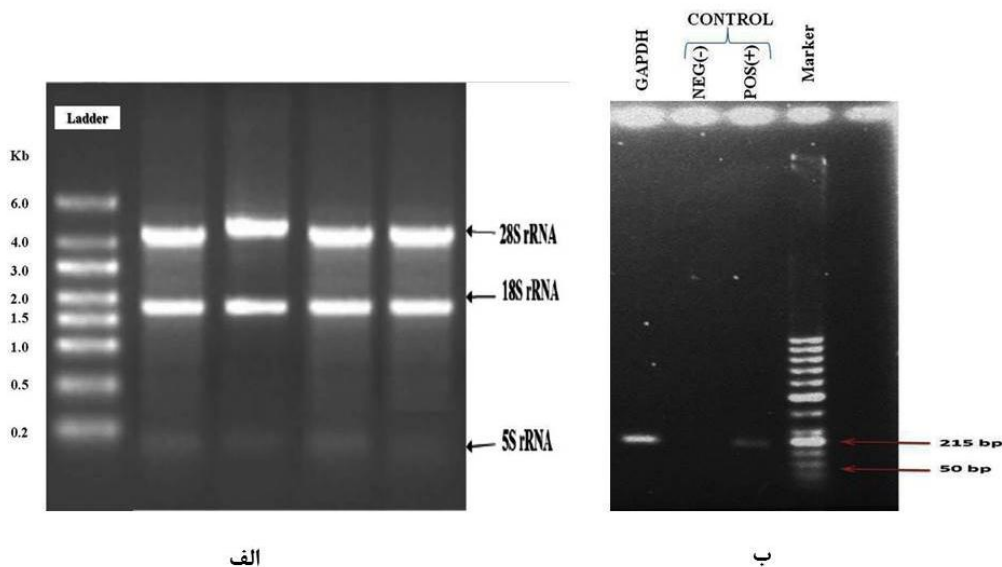
"Omega Factors" که به بیماران تجویز شد، توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی بدست آمده توسط نرم افزار SPSS در هر گروه محاسبه شد و توزیع نرمال نتایج، توسط آزمون Shapiro Wilks بررسی گردید. نتایجی که توزیع نرمال داشتند، توسط آزمون Independent Sample t-Test در دو گروه مقایسه شدند و نتایجی که توزیع نرمال نداشتند، توسط آزمون غیر پارامتری Mann Whitney باهم مقایسه شدند. مقادیر نیمه کمی پروتئین‌ها که بروش ایمنوهیستوشیمی بدست آمده بود، ابتدا به درصد تبدیل شد (یعنی به شدت رنگ حاصله از هر نمونه درصد تعلق گرفت مثلاً شدت رنگ +++++، ۱۰۰ درصد و +۲۵ درصد در نظر گرفته شد) و سپس توسط آزمون غیرپارامتری MannWhitney با همدیگر مقایسه شدند. این آزمون‌ها زمانی معنی دار در نظر گرفته شدند که مقدار p کمتر از ۰/۰۵ بود.

مقدار p برابر با ۰/۰۲ بود. در شکل ۱- ب، میزان نیمه کمی پروتئین آنزیم کاسپاز-۸ فعال، نشان داده شده است. نتایج مربوط به تغییرات میزان پروتئین آنزیم کاسپاز-۸ فعال می تواند تاییدی بر میزان تغییرات بیان ژن آنها باشد. نتایج بدست آمده از منفی (-) تا +۴ (++++ مثبت) گزارش گردید که در شکل ۲- نشان داده شده است. این نتایج سپس زیر نظر مشاور آمار به درصد تبدیل شد و بدلیل مستقل بودن گروه های مورد مطالعه، توسط آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney U با همدیگر مقایسه شدند. که نتایج در نمودار ۲- بطور کامل ارایه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، درصد پروتئین کاسپاز-۸ در گروه مورد (۲/۹۸) نسبت به گروه کنترل (۱/۵۴) افزایش معنی داری را نشان می‌دهد، p برابر با ۰/۰۰۴ بود. این نتیجه در دو گروه مورد مطالعه تاییدی برای تغییرات بیان ژن آنزیم کاسپاز بررسی شده بود.

محاسبه گردید. سپس بدلیل مستقل بودن گروه‌های مورد مطالعه، میانگین نتایج بدست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه شد و توزیع نرمال نتایج، توسط آزمون Shapiro Wilks بررسی گردید. نتایجی که توزیع نرمال داشتند، توسط آزمون Independent Sample t-Test در دو گروه مقایسه شدند و نتایجی که توزیع نرمال نداشتند، توسط آزمون غیر پارامتری Mann Whitney باهم مقایسه شدند. مقادیر نیمه کمی پروتئین‌ها که بروش ایمنوهیستوشیمی بدست آمده بود، ابتدا به درصد تبدیل شد (یعنی به شدت رنگ حاصله از هر نمونه درصد تعلق گرفت مثلاً شدت رنگ +++++، ۱۰۰ درصد و +۲۵ درصد در نظر گرفته شد) و سپس توسط آزمون غیرپارامتری MannWhitney با همدیگر مقایسه شدند. این آزمون‌ها زمانی معنی دار در نظر گرفته شدند که مقدار p کمتر از ۰/۰۵ بود.

یافته ها

اطلاعات دموگرافی بیماران، با استفاده از آزمون independent-samples t-Test و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ با همدیگر مقایسه شدند و از نظر سن، جنس، قندخون ناشتا، کلسترول و تری گلیسرید با همدیگر بخوبی همسان سازی شده بودند و اختلاف معناداری بین آنها وجود نداشت (جدول ۲) ($p < 0.05$). کروماتوگرام بدست آمده از آنالیز اسیدهای چرب امگا موجود در کپسول های امگا (-Natural Factors Ultimate)



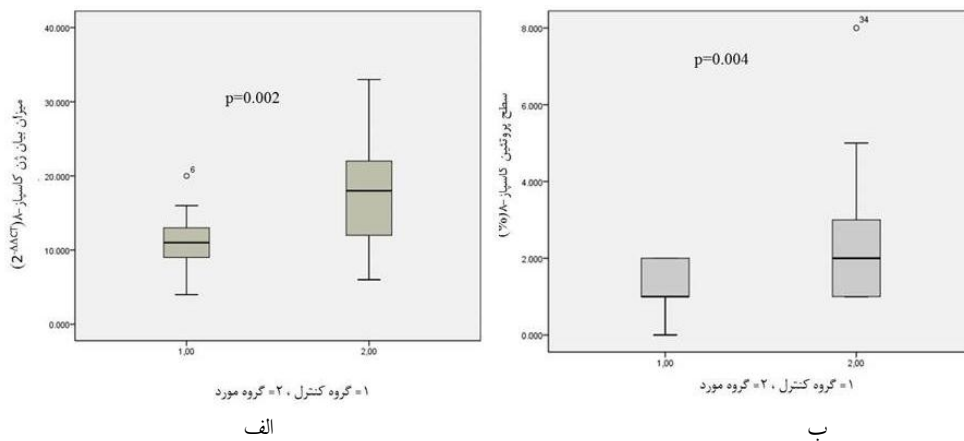
شکل ۱- باند های الکتروفورز ۲۸rRNA s و ۱۸rRNA s (الف) و نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول PCR (ب)

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به ژن های مورد مطالعه

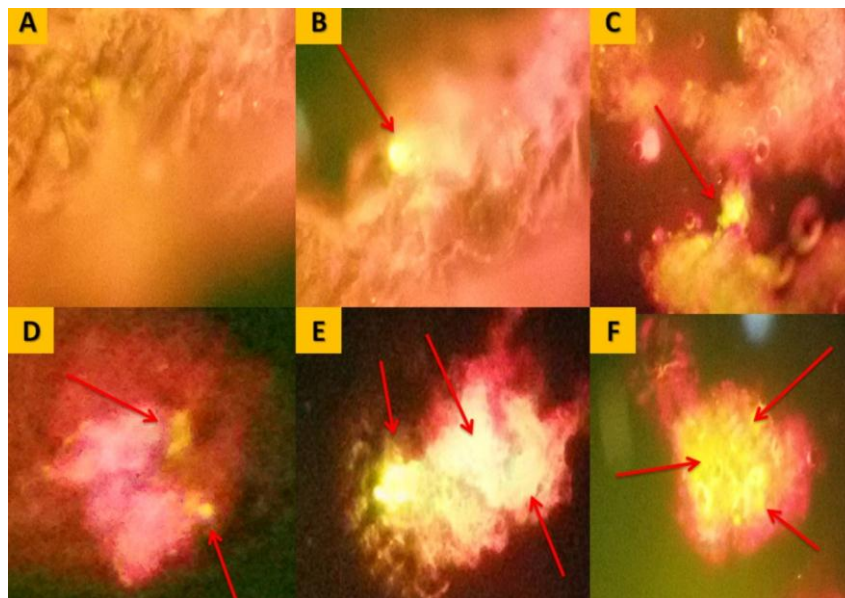
Caspase-8 primer	Sequence (5'→3')	NCBI Reference Sequence
Forward primer	GGGACAGGAATGGAACACAC	XM_005246894.2
Reverse primer	AGATGATGCCCTTGTCTCCA	
GAPDH primer		
Forward primer	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	XM_005253678.1
Reverse primer	GAAGATGGTGATGGGATTTC	

جدول ۲: اطلاعات دموگرافی بیماران شرکت کننده در مطالعه

گروه ها	کنترل	مورد	p
سن (سال)	۵۱/۵۲±۱۰/۴۷	۵۷/۲۹±۱۰/۶۵	۰/۶۸
جنس	۹	۹	۰/۵۵
مذکر ۱۸ نفر	۸	۸	
مونث ۱۶ نفر			
قد	۸۸/۰۳±۹/۳۶	۹۲/۷۶±۱۰/۴۸	۰/۶۰
کلسترول	۱۳۶/۲۶±۲۴/۴۶	۱۱۰/۱۸±۲۰/۷۵	۰/۱۵
تری گلیسرید	۹۳/۲۳±۱۶/۸۵	۸۰/۲۴±۱۰/۰	۰/۱۸



نمودار ۱ - الف. مقایسه بیان ژن آنزیم کاسپاز ۸- در دو گروه مورد مطالعه



شکل- ۲. نتایج حاصل از روش برش انجمادی و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. شدت رنگ برای کاسپاز ۸- از منفی (-) تا به شدت مثبت (++++) نشان داده شده است. (A) منفی (عدم بیان کاسپاز-۸ در معده)، (B) -/+ (مثبت خیلی ضعیف)، (C) + (مثبت ضعیف)، (D) ++ (مثبت متوسط)، (E) +++ (مثبت شدید)، (F) ++++ (مثبت خیلی شدید). مقدار نیمه کمی پروتئین کاسپاز-۸ به روش Frozen Section و ایمونوهیستوشیمی انجام گرفت. بدین منظور یک نمونه بیوپسی بلافاصله به تانک ازت متقل و آبگیری و منجمد شد. مقطع های ۴ میکرونی از بافت منجمد تهیه در بافر سیترات قرار گرفتند. جهت جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی، نمونه ها توسط skim milk بلوکه شده و سپس نمونه ها با آنتی بادی های اولیه مونوکلونال بر علیه پروتئین کاسپاز-۸ در ۴°C و به مدت یک شب انکوبه شدند. بعد از ۳ بار شستشو با بافر TBST، آنتی بادی ثانویه اضافه گردیده و به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. برای ظهور پروتئین ها از DAB به عنوان سوبسترا و از رنگ هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه برای رنگ آمیزی زمینه و از رنگ رودامین برای ایجاد فلورسنت استفاده شد و سپس لام ها با میکروسکوب فلورسنت Olympus BX41 مطالعه شدند.

بحث

(۲۵). مطالعه Mojtaba Mohaddes و Dokht Ghanbarzadeh نشان داد که مصرف اسیدهای چرب امگا همراه با سیس پلاتین در بیماران با آدنوکارسینوما گاستریک، منجر به کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bcl-2 می شود (۲۶). که نتایج این مطالعه با مطالعه ایشان همخوانی داشت. مطالعه شریعی و همکاران نشان داد که مصرف اسیدهای چرب امگا سبب افزایش بیان آنزیم فسفولیپاز A2 در بیماران با سرطان گاستریک می شود (۲۷). این آنزیم یکی از عوامل کاهنده متاستاز است. با توجه به اینکه سطح آنزیم‌های دسچوراز و الانگاز در سلول‌های اپیتلیال معده کمتر می باشد گمان نمی رود که اسیدهای چرب مصرف شده از جمله لینولئیک اسید و آلفا لینولئیک اسید به اسیدهای چرب با زنجیره طولانی مثل آراشیدونیک اسید و DHA تبدیل شود. بنابراین اثرات مطلوب اسیدهای چرب به متابولیت های آنها نسبت داده نمی شود بلکه این تاثیر، ذاتا به خود اسیدهای چرب بر می گردد. تعداد پیوندهای دو گانه اسیدهای چرب با قدرت این اسیدهای چرب در ریشه کنی و کاهش مقاومت دارویی ارتباط مستقیم دارد و در واقع تعداد پیوندهای مضاعف تعیین کننده اثرات آنتی باکتریال اسیدهای چرب است (۲۸).

نتیجه گیری

مصرف اسیدهای چرب غیر اشباع امگا همراه با استاندارد تراپی در کاهش مقاومت دارویی موثر است، بنابراین مصرف این دسته از اسیدهای چرب می تواند در کارایی استاندارد تراپی موثر واقع شود.

قدر دانی

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این مطالعه یاری کردند، کمال امتنان را دارند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع ۱۳۹۴،۶۴۱ به تایید رسیده است.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۱۴۱/۲۲۳ از طرف موسسه مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

نویسندگان اعلام می دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

ر.ش، م. ن و همکاران، طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را برعهده داشته، همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید می نمایند.

هلیکوباکتر پیلوری در موکوس معده تجمع یافته و منجر به گاستریت مزمن و زخم پپتیک می شود، در سال ۱۹۹۴ این باکتری به عنوان کارسینوژن شناخته شد. این باکتری در سلول های انسان باعث تغییر سیگنال و منجر به فعال شدن برخی از فاکتورهای رونویسی می شود (۱۸). نشان داده شده است که برخی از اسیدهای چرب غیر اشباع امگا، رشد باکتری را مهار می کنند. همچنین، غلظت ۱ mM برخی از اسیدهای چرب، سبب مرگ ۵۰ درصدی باکتری و غلظت ۲mM آنها، همه باکتری‌ها را نابود می سازد (۲۰، ۱۹). نشان داده شده است که توانایی مهار رشد باکتری و کلونیزاسیون گاستریک اسیدهای چرب غیر اشباع امگا -۳ در موش، منحصر به DHA است (۲۱). در این مطالعه نشان داده شد که استفاده از اسیدهای چرب امگا به همراه آنتی بیوتیک درمانی متداول، می تواند میزان آپوپتوز را در بافت معده بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری افزایش دهد، که یک یافته بسیار مهم برای کاهش مقاومت دارویی در این بیماران است. علاوه بر این در ارتباط با اسیدهای چرب، موارد نادری از مقاومت باکتری ها گزارش شده است. این باکتری با القای ژن های آنتی آپوپتوزی مثل Bcl-2, Bcl-Xl باعث ایجاد سرطان می شود (۲۲). مهار آپوپتوز سلول دلیل اصلی وجود مقاومت سلول به داروها است. عفونت به این باکتری و تولید برخی از پروتئین ها توسط باکتری از جمله تعدادی از مهار کننده های آپوپتوز، سبب یویکوئیتنه شدن و در نتیجه تخریب کاسپاز ۱ و کاسپاز ۳ شده که دو مولکول کلیدی در آبشار آپوپتوز می باشند (۲۲). همانطور که در نمودار ۱- مشاهده می شود، میزان پروتئین و میزان بیان ژن کاسپازهای ۸- در گروه مورد یعنی بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با علائم دیس پپتیک که به همراه درمان استاندارد سه گانه، اسیدهای چرب PUFAs نیز دریافت کردند، نسبت به گروه کنترل خود یعنی بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با علائم دیس پپتیک که فقط درمان استاندارد سه گانه دریافت نموده بودند، افزایش معنی داری را نشان داده است. مطالعه Sharifi و همکارانشان داد که مصرف خوراکی اسیدهای چرب غیر اشباع امگا همراه با استاندارد تراپی منجر به افزایش بیان پروتئین های پیش آپوپتوزی مثل Bad و کاهش بیان پروتئین های آنتی آپوپتوزی مثل Bcl-2 در بافت معده می شود (۲۳). همچنین مطالعه Dolatkah و همکاران نشان داد که مصرف اسیدهای چرب امگا کارایی شیمی درمانی را در بیماران با سرطان معده تحت شیمی درمانی، افزایش داده و سبب افزایش معنی دار کاسپاز-۹ و افزایش غیر معنی دار کاسپاز-۸ در این افراد در مقایسه با گروه کنترل گردید (۲۴). اسیدهای چرب امگا علاوه بر دخالت در آپوپتوز از فرایندهای مختلفی برای مقابله با باکتری استفاده می کنند. یکی از مکانیسم های مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک ها، برداشت کلسترول از سلول میزبان و گلیکوزیله کردن آن و جادادن آن در غشای خود است. نشان داده شده است که دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) با ایجاد ساختار سنجاق سر، کلسترول را از سلول باکتری بیرون کشیده و در نتیجه باکتری به آنتی بیوتیک حساس می شود

References

- Dolatkhah H, Rahbani-Nobar M, Fattahi E, Ansari M, Mirza-Aghazadeh A, Eftekhari-Vash L, et al. Evaluation of glycemic control, gastric juice nitric oxide and oxidative stress in diabetic patients infected by Helicobacter pylori. *J Med Gen Genom* 2011; **3**(1): 1-6.
- Richard White J, Winter A, Karen Robinson J. Differential inflammatory response to Helicobacter pylori infection: etiology and clinical outcomes. *J Inflamm Res* 2015; **8**: 137-147. doi: 10.2147/JIR.S64888
- Sharifi R, Nouri M, Dolatkhah H, Estakhri R, Shirmohammadi M, Miroliaei M. The Effect of oral administration pufas on oxidative stress in patients infected by helicobacter pylori with dyspeptic symptom. *Med chem* 2017; **7**(11): 324.
- Waldum H, Kleveland P, Sørđal F. Helicobacter pylori and gastric acid: an intimate and reciprocal relationship. *Therap Adv Gastroenterol* 2016; **9**(6): 836-844. doi: 10.1177/1756 283X16663395
- Chen D F, Hu L, Yi P, Liu W W, Fang D C, Cao H. H pylori exist in the gallbladder mucosa of patients with chronic cholecystitis. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 1608-1611. doi: 10.3748/wjg.v13.i10.1608
- Lee M, Suk Park J, Kyung C, Jung Baik S, Kwon Lee B, Kim J H, et al. Current Helicobacter pylori infection is significantly associated with subclinical coronary atherosclerosis in healthy subjects: A cross-sectional study. *PLoS One* 2018; **13**(3): 1-13. doi: 10.1371/journal.pone. 0193646
- Sung K C, Rhee E J, Ryu S H, Beck S H. Prevalence of Helicobacter pylori infection and its association with cardiovascular risk factors in Korean adults. *Int J Cardiol* 2005; **102**: 411-417. doi: 10.1016/j.ijcard.2004.05.040
- Chung G E, Heo N J, Park M J, Chung S J, Kang H Y, Kang S J. Helicobacter pylori seropositivity in diabetic patients is associated with microalbuminuria. *World J Gastroenterol* 2013; **19**(1): 97-102.
- Shimoyama S. Diabetes mellitus carries a risk of gastric cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterology* 2013; **19**(40): 6902-6910. doi: 10.3748/wjg.v19.i40.6902
- Ford A C, Forman D, Hunt R, Yuan Y, Moayyedi P. Helicobacter pylori eradication for the prevention of gastric neoplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015; **7**: 1-54. doi: 10.1002/14651858.CD005583.pub2
- Poreba M, Szalek A, Kasperkiewicz P, Rut W, Salvesen G S, Drag M. Small molecule active site directed tools for studying human caspases. *Chem Rev* 2015; **115**: 12546-12629.
- Reed C J. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol* 2000; **157**(5): 1415-1430. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64779-7
- Díaz P, Valenzuela Valderrama M, Bravo J, Quest A. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. *Front Microbial* 2018; **9**: 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2018.00005
- Hollander D. Dietary Essential Fatty Acids in the Prevention of Gastric Mucosal Injury. *Drug Invest* 1990; **2**: 7-9.
- Correia M, Michel V, Matos A A, Carvalho P, Oliveira M J, Ferreira R M, et al. Docosahexaenoic acid inhibits Helicobacter pylori growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PLoS One* 2012; **7**(4): e35072.
- Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; **37**(8): 911-917. doi: 10.1139/o59-099
- Plumas J, Palmerini F. Correlation between apoptosis macroarray gene expression profiling and histopathological lymph node lesions. *Mol Pathol* 2001; **54**(1): 17-23. doi: 10.1136/mp.54.1.17
- Perez-Perez I, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2004; **9**Suppl1: 1-6. doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00248.x
- Li C, Li H, Jiang Z, Zhang T, Wang Y, Li Z, et al. Interleukin-33 Increases Antibacterial Defense by Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin. *PLOS Pathog* 2014; **10**(2): e1003918. doi: 10.1371/journal.ppat.1003918
- Petschow B W, Batema R P, Ford L L. Susceptibility of Helicobacter pylori to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 302-306.
- Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013; **62**(1): 34-42. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302254
- Miyazawa M, Suzuki H, Masaka T, Kai A, Suematsu M, Nagata H, et al. Suppressed apoptosis in the inflamed gastric mucosa of Helicobacter Pylori colonized iNOS knockout mice. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**(12): 1621-1630. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00218-1
- Sharif R, Nouri M, Eidi A, Noormohammadi Z, Dolatkhah H, Shirmohammadi M. Dietary PUFA Increase Apoptosis in Stomach of Patients with Dyspeptic Symptoms and Infected with *H. pylori*. *Lipids* 2017; **8**: 1-12. doi: 10.1007/s11745-017-4257-y

24. Dolatkhah H, Movahedian A, Somi M H, Aghaei M, Samadi N, Mirza-Aghazade A, et al. Effect of PUFAs Oral Administration on the Amount of Apoptotic Caspases Enzymes in Gastric Cancer Patients Undergoing Chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2002; **17**(1): 93-101. doi: 10.2174/1871520616666160520113503
25. Noto J, Peek J. The Helicobacter pylori cag Pathogenicity Island. *Methods Mol Biol* 2012; **7**: 41-50. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_7
26. Ghanbarzadeh H D, Mohaddes M. The Effect of Omega Fatty Acids on Bcl-2 Gene Expression and Protein Production in Cancerous Gastric Tissue. *Multidiscip Cancer Investig* 2017; **1**(4): 24-28. doi: 10.21859/mci-0104 5
27. Shariati M, Aghaei M, Movahedian A, Somi M-H, Dolatkhah H, Mirza Aghazade A. The effect of ω -fatty acids on the expression of phospholipase A2 group 2A in human gastric cancer patients. *J Res Med Sci* 2016; **21**: 1-12. doi: 10.4103/ 1735-1995.177358
28. Caterina R, Bernini W, Carluccio M. Structural requirements for inhibition of cytokine induced endothelial activation by unsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 1998; **39**(5): 1062-1070. doi: 10.1007/BF02562285