مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
دوره ۶۴، شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۸۵، ۱۷۲-۱۷۹

بررسی چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به هفت رده سلول کشت شده انسانی

دکتر ناهید رحیمی‌فرد*،دکتر اکبر میرصالحیان*، دکترپرویزمالک‌نژاد*، دکتر ناصر ابراهیمی دریانی (دانشیار)**
*متخصص میکروب‌شناسی پزشکی، گروه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران
** گروه داخلی بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری عامل گاستریت مزمن فعال، زخم‌های معده و اثنی‌عشر در انسان و یک عامل کمکی در ایجاد سرطان معده و تومورهای لنفوئیدی مخاط است. اولین و مهمترین قدم برای ایجاد عفونت و بیماریزایی، چسبیدن باکتری به مخاط معده می‌باشد. لذا استفاده از مواد مهار کننده فاکتور چسبندگی باکتری و ممانعت از اتصال روشهای جدید درمانی در بیماریهای عفونی را مطرح می‌سازد. در نتیجه ارائه روش مناسب برای چسبندگی از جایگاه خاصی برخوردار می‌شود.

روش بررسی: با مقایسه روشهای گزارش شده از نظر نوع سلول ،غلظت شیرابه سلولی و باکتری، مدت زمان تماس و دمای مجاورت با ادغام و یا تغییر آنها روش مناسب برای چسبیدن هلیکوباکتر به سلولها بدست آمد و چسبندگی ۲۲سوش هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیوپسی انتر معده یا دوازدهه ٤٩ بیمار با علائم دیس پپسی، گاستریت، زخم معده، زخم اثنی‌عشر و ... که تحت اندوسکوپی قرار گرفته بودند به هفت رده سلول انسانی از طریق ELISA با استفاده از فعالیت اوره‌آزی هلیکوباکتر پیلوری (Urea Phenol Red(UPR بررسی شد.

یافته‌ها: استفاده از غلظت شیرابه میکروبی معادل لوله ۱ مک فارلند برای هلیکوباکتر پیلوری و شیرابه سلولی حاوی ۱۰×۵ سلول در میلی‌لیتر، زمان ۹۰ دقیقه مجاورت باکتری با سلول در۳۷ درجه سانتیگراد منجر به حداکثر چسبندگی شد. بین ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری از نظر چسبیدن به سلولها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. هلیکوباکتر پیلوری به تمام هفت رده سلولی مورد استفاده در شرایط invitro می‌چسبد و درصد چسبندگی به سلولها به ترتیب از HT29, HT29/219, AGS, SW742, HeLa, HepII تا Caco-2 کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد و بهترین چسبندگی به سه رده سلول اول بود.

نتیجه‌گیری: برای بررسی‌های چسبندگی، ممانعت از چسبندگی و جداسازی استفاده از روش چسبندگی ارائه شده در این تحقیق توصیه می‌شود و از بین هفت رده سلول آزمایش شده سه رده سلولی Sw742, HeLa, HepII پیشنهاد می‌گردند و از بین این سه رده سلول HepII بعنوان سلول مناسب برای استفاده در ای‌ن گونه تحقیقات معرفی می‌گردد.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، چسبندگی، کشت سلول، ELISA, UPR

زمینه و هدف

هلیکوباکترپیلوری پس از اولین مشاهدات باکتریهای اسپریل شکل در معده انسان و حیوانات در سال ۱۸۸۱ توسط و مشاهدات و بررسی‌ها و کشت در سالهای بعد توسط دیگر محققین، سرانجام در سال ۱۹۸۹ به این نام نامگذاری و در جنس جدیدی بنام Helicobacter از فامیل Helicobacteraceae در راسته Campylobacterales کلاس Epsilon proteobacteria شاخه Proteobacteria قرار گرفت (۱) با توجه به نقش ثابت شده هلیکوباکتر پیلوری در آدنوکارسینومای معده، تومورهای لنفوییدی مخاط،

Archive of SID
www.SID.ir

زخم‌های معده و اثنی عشر و گاستریت و همچنین کارسینوژن بودن این میکروارگانیسم، درمان و یا پیشگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری مورد اهمیت واقع شده است (٤-٢). از آنجا که قدم اولیه در ایجاد عفونت، چسبیدن و جایگزینی هلیکوباکتر پیلوری در مخاط معده می باشد (٦،٥). لذا اخیرا روش‌های درمانی جدید که از طریق ممانعت از چسبندگی این باکتری به مخاط معده است نظیر مشتقات شیر یا آغوز، عصاره‌های گیاهی، مواد ضد زخم و غیره پیشنهاد می‌شود (٥،٧،٦). جهت بررسی اثرات ضد چسبندگی این مهار کننده‌ها از خاصیت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری (٨،٩) به رده‌های سلولی مختلف در آزمایشگاه می توان بهره جست. چسبیدن هلیکوباکتر پیلوری به رده‌های مختلف سلولی در آزمایشگاه تحت شرایط خاصی صورت می‌پذیرد و یافتن و ارائه این شرایط خاص برای شروع تحقیقات فوق بسیار ارزشمند است. در این بررسی با ارائه روش مناسب جهت چسبندگی و مقایسه چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به هفت رده سلولی ۲- .Caco HepII. AGSHeLa, HT29, HT29/219. SW742به روش Urea Phenol Red(UPR) (٧) ابتدا سلولهای فوق را از نظر قدرت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری رده‌بندی تا با ارائه یک روش عملی رده سلولی مناسب از نظر چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری تعیین گردد.

روش بررسی

باکتری‌ها و شرایط رشد

۲۲سوش هلیکوباکتر پیلوری از بیوپسی ناحیه انتر معده ٤٩ بیمار مراجعه کننده جهت اندوسکوپی جدا شد روش کار به این صورت بود که ابتدا یک قطعه بیوپسی در یک میلی لیتر محیط تایوگلیکولات حاوی مکمل آنتی‌بیوتیکی قرار داده شد(حداکثر زمان نگهداری و انتقال نبایستی بیش از ۳ ساعت باشد).

یک قطعه دیگر بیوپسی برای تهیه اسمیر مستقیم بین دو لام فشرده و اسمیر تماسی تهیه شد و لامها پس از فیکس شدن با متانل به روش رنگ‌آمیزی گی‌مسا رنگ‌آمیزی شدند. تست اوره از سریع برای قطعه دیگر بیوپسی در اتاق اندوسکوپی انجام شد.

برای کشت در محیط کلمبیا قطعات بیوپسی را در هاون چینی استریل کاملاً خرد و له کرده و سرسع در محسط کشت کلمبسا آگار کشت صورت گرفت و محیطها در انکوباتور CO_2 (($10\%CO_2$ با شرایط میکروآئروفیلیک بمدت ۵ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت کلنی‌های هلیکوباکتر پیلوری به اندازه ۱-۲ میلی‌متر محدب با لبه‌های صاف، بدون رنگ روی محیط ظاهر شدند تست‌های تشخیصی اکسیداز، کاتالاز، اوره از و حساسیت به سفالکسین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید و رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌ها انجام شد. پس از تائید آزمایشات تشخیصی برای هلیکوباکتر پیلوری باکتری‌های بدست آمده، در آزمایش چسبندگی (Attachment) از پاساژ اول تا حداکثر پنجم استفاده شدند و برای نگهداری آنها نیز از فتال کالف سرم حاوی ۲۰٪ گلیسرول استفاده شد.

سوسپانسیون باکتری برای آزمایش Attachment

در روز آزمایش از کشت تازه هلیکوباکتر پیلوری سوسپانسیونی معادل استانداردهای ۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند در PBS (به ترتیب غلظت‌های ۱/۵×۱۰، ۳×۱۰، ٦×۱۰ cfu/ml تهیه شد.

رده‌های سلولی

لولهای AGS, HT29/219, HT29, Sw742, Caco-2, HepII, HeLa بانک سلولی انستیتو پاستور ایران در محیط MDME (Sigma) حاوی ۱۰٪ فتال کالف سرم پاساژ و در انکوباتور CO2 با 6% CO2 نگهداری شدند.

آماده‌سازی سلولها برای آزمایش چسبندگی

٤٨ ساعت قبل از آزمایش از هر نوع سلول پس از تریپسینه کردن و تغلیظ سوسپانسیون سلولی حاوی ۵×۱۰ cell/ml تهیه شد. شمارش سلولها بدنبال مخلوط ساختن آنها با رنگ کرزیل بلو ۱٪ بطور هم حجم و توسط لام نئوبار صورت گرفت. سپس از سوسپانسیون سلولی برای تشکیل منولایر در

Archive of SID

www.SID.ir

چاهک‌های میکروپلیت (Biomat ساخت ایتالیا) ۱۰۰ میکرولیتر ریخته و تا زمان آزمایش (حداقل ٤٨ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت بعد)در انکوباتور CO2(CO2 6%)نگهداری شدند.

آزمایش چسبندگی Attachment assay

در روز آزمایش میکروپلیت‌های حاوی منولایر سلولی سه بار با PBS شستشو شده وبا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ٢٤ ساعته هلیکوباکترپیلوری با غلظت‌های۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند مجاورت داده شدند سپس به چند روش ۲۰،۱۵، ۳۰ و ٦٠ دقیقه در دمای محیط با حرکت روی روتاتور و ۹۰،۳۰،۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد (انکوباتور CO2) گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت چاهک‌ها سه بار با محلول شستشوی سرم فیزیولوژی حاوی ۰/۰۳٪ فنل رد برای حذف باکتری‌هایی که به سلولها در کف میکروپلیت نچسبیده‌اند شسته شده و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۲٪ اوره و ۰/۳۰٪ فنل رد اضافه و پس از زمانهای ۳۰،۱۵،۰ و ٤٥ دقیقه در محیط آزمایشگاه و ۳۰،۱۵و ٤٥ دقیقه در انکوباتور CO2 دمای ۳۷، توسط دستگاه الیزا ریدر Anthos2020 در طول موج ۵۵۰ نانومتر میزان جذب نوری (OD) هر چاهک خوانده شد. کنترل مثبت، چاهک‌های حاوی سوسپانسیون باکتری و کنترل منفی، چاهک‌های حاوی فقط سلول بوده که سوسپانسیون باکتری به آنها اضافه نشده بود.ضمناً آزمایش بصورت حداقل دوتایی برای هر سوش باکتری با هر نوع سلول انجام شد.

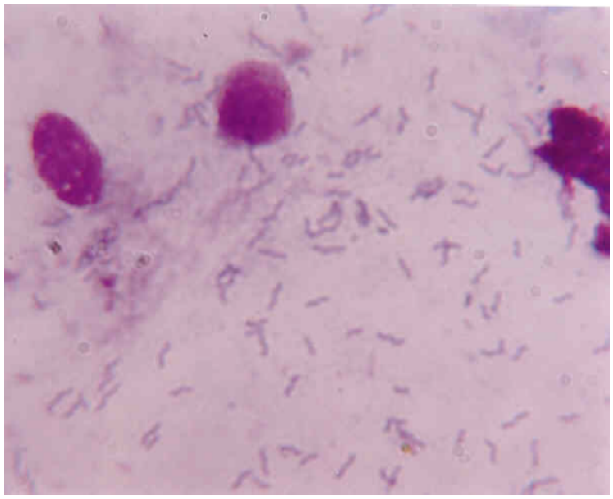
درصد چسبندگی از فرمول زیر محاسبه شد

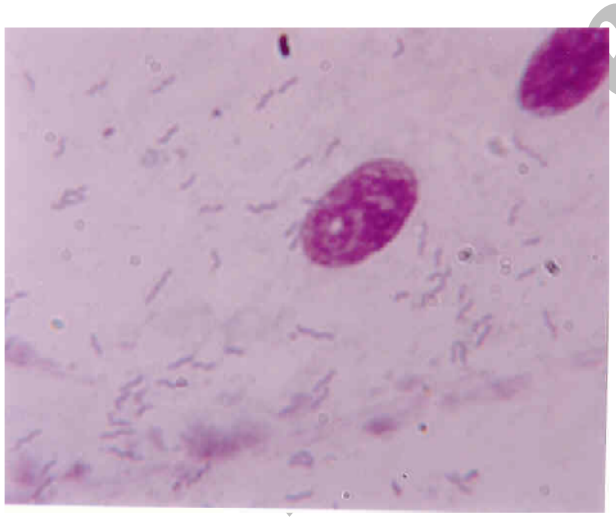
$$\text{درصد چسبندگی} = \frac{\text{ODTest} - \text{ODnegative}}{\text{ODpositive}}$$

یافته‌ها

دراسمیرهای تماسی مربوط به بیماران آلوده با رنگ آمیزی گیمسا سلولهای اپی‌تلیال معده و تجمعی از هلیکوباکترهای خمیده دیده شد(تصاویر ۱و۲).

آزمایشهای اوره از سریع در اتاق اندوسکوپی برای ٤٩ بیمار انجام شد که ۲۵تست (۵۱٪) مثبت شد(تصویر ۳). از ٤٩ کشت انجام شده ۲۲کشت (٤٤/۸۹٪)از نظر هلیکوباکترپیلوری مثبت بود که دارای واکنش‌های اوره از؛ اکسیداز؛ کاتالاز مثبت و مقاوم به نالیدیکسیک اسید و حساس به سفالکسین بودند و در رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌ها اسپریل‌های خمیده گرم منفی مشاهده شد (تصویر ٤). در آزمایش چسبندگی هلیکوباکترپیلوری به رده‌های سلولی بهترین چسبندگی با سوسپانسیون باکتریایی معادل ۱ مک فارلند (غلظت) 3×10 cfu/ml بدست آمد.





تصویر ۱ و ۲- هلیکوباکتر پیلوری در اسمیر تماسی از بیوپسی معده، رنگ‌آمیزی گیمسا

تمام ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری به ۷ رده سلولی مورد مطالعه چسبندگی را در عرض ۵ تا ۱۰ دقیقه نشان دادند (تصاویر ۵ و ٦).

www.SID.ir

بین ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری از نظر چسبندگی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱). ولی در میزان چسبندگی به ۷ رده سلولی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد، چسبندگی به سلولها به ترتیب از HT29, HT29/219, AGS, SW742, HeLa, HepIIتا Caco-2 کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد و بهترین چسبندگی به سه رده سلول اول بود و از بین این سه رده سلول HepII بعنوان بهترین و مناسب‌ترین سلول بود (جدول ۲).

شکل شماره ۳- تستهای تشخیصی هلیکوباکتر پیلوری، اوره آز رپید، اکسیداز، اوره آز، حساسیت به سفالکسین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید

شرایط و زمان مجاورسازی باکتریها با سلولها در میزان چسبندگی نقش داشته و برای تفریق و ارزیابی چسبندگی شرایط و زمان مناسب در بین روش‌های آزمایش شده زمان ۹۰ دقیقه باعث بیشترین چسبندگی به تمام رده‌های سلولی شد (جدول ۳).

در دمای آزمایشگاه و زمان‌های ۳۰،۱۵ و ۶۰ دقیقه چسبندگی انجام شد ولی میزان آن پایین‌تر از شرایط فوق بود.

زمان مناسب در روش UPR برای خواندن با دستگاه الیزا ریدر پس از افزودن محلول سالین‌فنل رد اوره و نگهداری میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور CO245دقیقه بود. روش مناسب برای نگهداری سلول‌ها استفاده از فتال‌کالف سرم حاوی ۱۰٪ DMSOو برای نگهداری هلیکوباکترپیلوری از فتال‌کالف سرم حاوی ۲۰٪ گلیسرول در برودت ۷۰- درجه سانتیگراد بود.

جدول شماره ۱- مقایسه چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری به ۷ رده سلولی سلول

		Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
HEP2	بین گروه‌ها	۹۳۹/۳۱۲	۲۱	۴۴/۷۲۹	۰/۰۷۶	۱/۰۰۰
	خارج از گروه	۷۷۳۵۸/۹۵۱	۱۳۲	۵۸۶/۰۵۳		
	نتیجه	۷۸۲۹۸/۲۶۲	۱۵۳			
HELA	بین گروه‌ها	۳۱۳/۶۷۵	۲۱	۱۴/۹۳۷	۰/۰۷۷	۱/۰۰۰
	خارج از گروه	۲۵۶۳۴/۵۹۴	۱۳۲	۱۹۴/۲۰۱		
	نتیجه	۲۵۹۴۸/۲۶۸	۱۵۳			
SW742	بین گروه‌ها	۳۰۲/۳۵۱	۲۱	۱۴/۳۹۸	۰/۸۳۲	۰/۶۷۷
	خارج از گروه	۲۲۸۴/۲۳۶	۱۳۲	۱۷/۳۰۵		
	نتیجه	۲۵۸۶/۵۸۷	۱۵۳			
AGS	بین گروه‌ها	۳۴۱/۳۳۷	۲۱	۱۶/۲۵۴	۰/۳۲۸	۰/۹۹۸
	خارج از گروه	۶۴۹۷/۵۵۹	۱۳۲	۴۹/۶۰۰		
	نتیجه	۶۸۳۸/۸۹۷	۱۵۳			
HT29219	بین گروه‌ها	۳۴/۷۵۹	۲۱	۱/۶۵۵	۰/۰۸۶	۱/۰۰۰
	خارج از گروه	۲۵۴۹/۷۲۲	۱۳۲	۱۹/۳۱۶		
	نتیجه	۲۵۸۴/۴۸۱	۱۵۳			
HT29	بین گروه‌ها	۳۳/۷۳۷	۲۱	۱/۶۰۷	۰/۰۰۳	۱/۰۰۰
	خارج از گروه	۷۵۱۳۱/۸۵۲	۱۳۲	۵۶۹/۱۸۱		

Archive of SID

www.SID.ir

	نتیجه	۷۵۱۶۵/۵۸۹	۱۵۳			
CACO2	بین گروه‌ها	۶/۵۳۵	۲۱	۰/۳۱۱		
	خارج از گروه	۲۱۸/۴۰۹	۱۳۲	۱/۶۵۵	۰/۱۸۸	۱/۰۰۰
	نتیجه	۲۲۴/۹۴۴	۱۵۳			

جدول شماره ۲- رده‌بندی سلول‌ها از نظر چسبندگی هلیکوباکترپیلوری

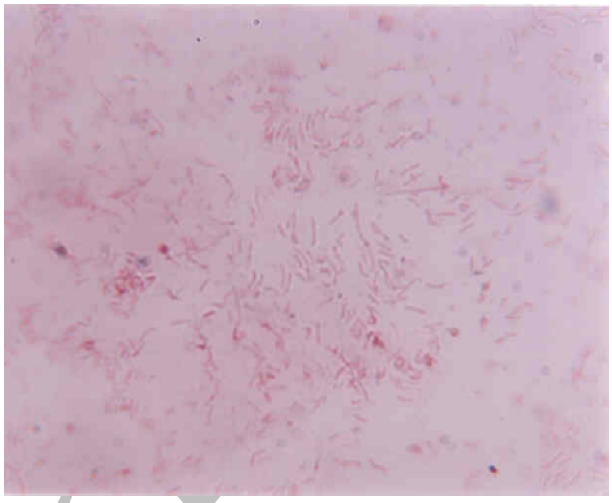
	n	Min	max	Mean	Std.Deviation
HEP2	۱۵۴	۱۳/۲۵۰	۱۰۶/۷۰۰	۶۷/۱۹۴۹۸	۲۲/۶۲۱۹۷
HELA	۱۵۴	۱۰/۲۵	۶۳/۹۳	۴۱/۶۴۶۴	۱۳/۰۲۲۹
SW742	۱۵۴	۲۳/۱۴	۶۵/۳۲	۲۸/۵۰۰۶	۴/۱۱۱۷
AGS	۱۵۴	۷/۶۹	۵۰/۳۲	۱۸/۷۴۰۷	۶/۷۰۷۷
HT29219	۱۵۴	۴/۰۰	۲۲/۳۰	۱۴/۷۴۹۲	۴/۱۱۰۰
HT29	۱۵۴	۳/۰۱	۳/۶۳	۸/۳۳۲۴	۲/۱۶۴۸
CACO2	۱۵۴	۰/۷۸	۶/۳۸	۳/۱۸۲۰	۱/۲۱۲۵
Valid N (listwise)	۱۵۳				

جدول شماره ۳- مقایسه میزان چسبندگی هلیکوباکترپیلوری در شرایط مختلف

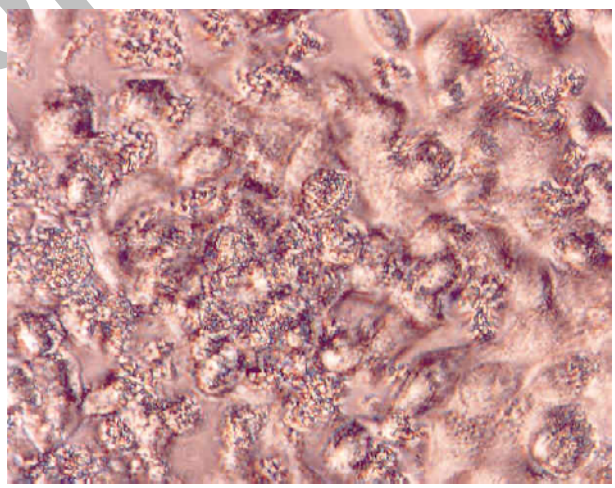
		Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
HEP2	بین گروه‌ها	۷۱۹۸۵/۷۶۷	۶	۱۱۹۹۷/۶۲۸		۰/۰۰۰
	خارج از گروه	۶۳۱۲/۴۹۵	۱۴۷	۴۲/۹۴۲	۲۷۹/۳۹۱	
	نتیجه	۷۸۲۹۸/۲۶۲	۱۵۳			
HELA	بین گروه‌ها	۲۳۵۴۰/۳۶۴	۶	۳۹۲۳/۳۹۴		۰/۰۰۰
	خارج از گروه	۲۴۰۷/۹۰۴	۱۴۷	۱۶/۳۸۰	۲۳۹/۵۱۹	
	نتیجه	۲۵۹۴۸/۲۶۸	۱۵۳			
SW742	بین گروه‌ها	۶۵۷/۱۵۴	۶	۱۰۹/۵۲۶		۰/۰۰۰
	خارج از گروه	۱۹۲۹/۴۳۳	۱۴۷	۱۳/۱۲۵	۸/۲۴۵	
	نتیجه	۲۵۸۶/۵۸۷	۱۵۳			
AGS	بین گروه‌ها	۴۸۶۷/۸۸۷	۶	۸۱۱/۳۱۵		۰/۰۰۰
	خارج از گروه	۱۹۷۱/۰۰۹	۱۴۷	۱۳/۵۰۰	۶۰/۰۹۷	
	نتیجه	۶۸۳۸/۸۹۷	۱۵۳			
HT29219	بین گروه‌ها	۲۴۲۲/۹۶۶	۶	۴۰۳/۸۲۸		۰/۰۰۰
	خارج از گروه	۱۶۱/۵۱۵	۱۴۷	۱/۰۹۹	۳۶۷/۵۳۷	
	نتیجه	۲۵۸۴/۴۸۱	۱۵۳	۱۲۴۹۳/۸۸۳		
HT29	بین گروه‌ها	۷۴۹۶۳/۲۹۵	۶	۱/۳۷۶		۰/۰۰۰
	خارج از گروه	۲۰۲/۲۹۴	۱۴۷		۹۰۷۸/۸۸۳	
	نتیجه	۷۵۱۶۵/۵۸۹	۱۵۳	۳۰/۰۸۹		
CACO2	بین گروه‌ها	۱۸۰/۵۳۵	۶	۰/۳۰۲	۹۹/۵۹۸	۰/۰۰۰

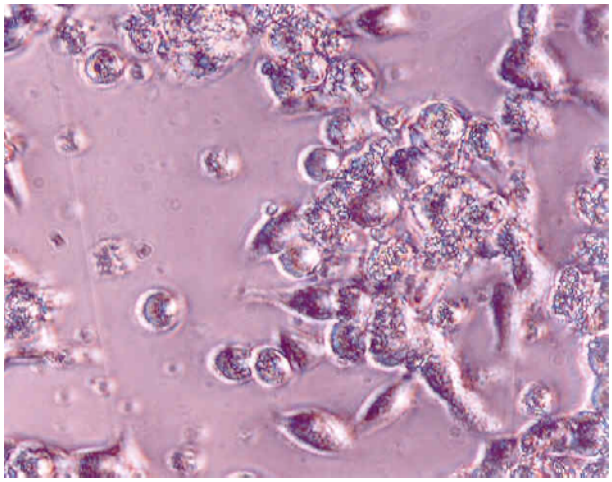
Archive of SID
www.SID.ir

	خارج از گروه	٤٤/٤١٠	١٤٧	
	نتیجه	٢٢٤/٩٤٤	١٥٣	



تصویر شماره ۴- هلیکوباکترپیلوری در اسمیر از کلنی، رنگ‌آمیزی گرم





تصویر ۵ و ۶- هلیکوباکترپیلوری چسبیده به سلول‌های کشت

بحث

چسبیدن باکتریهای پاتوژن به سلولهای هدف یک قدم مهم در پاتوژنز باکتریهای بیماریزا است (۵،٦،۱۲).

برای مثال بدنبال چسبیدن ارگانیسم‌ها به سطوح مخاطی دستگاه گوارش بافتهای میزبان در معرض غلظتهای بیشتری از انتروتوکسینهای باکتری قرار می‌گیرند (۱۲).چسبیدن برای ورود ارگانیسم‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال نیز مهم است. بررسی‌های بافت‌شناسی از نمونه‌های بیوپسی آنتر معده انسان نشان داده که هلیکوباکترپیلوری درون مخاط معده است (۱۲). کوتاه شدن میکروویلی‌ها و خرابی فیلامنت‌های سیتواسکلتال در نقاطی که باکتری چسبیده مشاهده می‌شوند. از نظر مرفولوژیکی این نواحی چسبندگی در سطح سلول کاملا مشابه جراحتهایی است که در روده‌های بزرگ و کوچک بعلت عفونت انتروپاتوژنیک E.coli مشاهده می‌شود (۱۲).

چسبیدن H.pylori به سلولهای انسانی در Invitro کاملا مشابه آنچه در Invivo مشاهده می‌شود می‌باشد(۱۲). آدهزین‌ها از جنس پروتئینها، گلیکوکنژوگه‌ها یا لیپیدهای باکتریایی هستند که در مراحل اولیه جایگزینی دخیل‌اند (۹).

هلیکوباکترپیلوری دارای ادهزینهای زیادی است از جمله LPS ،Bab A,Alp A,B,HopZ,Nap,Hpa A,Hsp60,70

Archive of SID

www.SID.ir

core,LPS O antigen,LPS, پروتئین‌های ۱۹،٦،۲۵،٦۱،٦۳ کیلودالتونی و گیرنده‌های سلولی لوئیس N,b استیل‌نورامینیل لاکتوز (سیالیک اسید)، لاکتوزیل سرامید سولفات، لامینین، لوئیس x، موسین، هپاران سولفات و دیگر پلی ساکاریدهای‌سولفاته، فسفاتیدیل اتانل امین، گانگلیوتری‌اسیل سرامید،۱ ... اینتگرین (۹).

در این تحقیق خصوصیات چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری به ۷ رده سلولی انسانی بررسی شد، در مطالعات زیادی چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به سلول‌های مختلف گزارش شده است از جمله :T84 توسط L.C.Theulaz و همکارانش در سال ۱۹۹٦ از فرانسه (۱۰)، HeLa و Kato III توسط Guzman-Murillo و همکارانش در سال ۲۰۰۱ از مکزیک (۱۱)،Vero cells توسط Hatay و همکارانش در سال ۱۹۹۹ از ژاپن (٦)،سلولهای،، Caco, HT29, HepII, AGS,Y1, HuTu-80 توسط P.M. Simon و همکارانش در سال ۱۹۹۷ از امریکا،Kato III توسط S.G.Hemalatha و همکارانش در سال ۱۹۹۱ از کانادا (۱۲)،AGS توسط R.P.H.Logan و همکارانش در سال ۱۹۹۷ از ژاپن (۱٤).

در این مطالعات روش‌های مجاورت باکتری با سلولها و زمان مجاورت (از ۲۰ تا ۱۵۰ دقیقه در دمای محیط و ۳۷ درجه سانتیگراد) و غلظتهای سوسپانسیون مبکروبی از cfu/ml 1×10, 5×10 متفاوت بوده است (۱۵،۱٤،۱۲،۱۰،۵). ما در غلظت 3×10 cfu/ml (۱مک فارلند)، و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۹۰ دقیقه مجاورت سلول و باکتری به یک روش مناسب جهت چسبندگی دست یافتیم .در اکثر این مطالعات چسبندگی به یک یا دو سلول بررسی شده بود و تنها مطالعه‌ای که ٦ رده سلولی را بررسی کرده (۷) مطالعه آقای دکتر سیمون می‌باشد که پس از مقایسه سلول‌های HepII و HuTu-80 را بهترین سلولها برای بررسی‌های چسبندگی اعلام کرده است و سلول HuTu-80 از آدنوکارسینوم دوازده انسان را بعلت حساسیت بیشتر به مواد ممانعت کننده جهت بررسی‌های ممانعت از چسبندگی انتخاب نموده است .

از سلولهایی که برای چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری در In vitro تا به حال گزارش شده‌اند ۷ رده سلولی در بانک سلولی ایران موجود بود که در مطالعه حاضر از آنها استفاده شد و از بین آنها نیز سلول HepII بعلت ایجاد منولایرهای با حداقل Gap بهترین سلول برای آزمایشات بررسی چسبندگی بدست آمد که مطالعه آقای سیمون نیز در بین ٦ رده این نتیجه را تائید می‌کند (۷).

از روش‌های سنجش چسبندگی نیز روش‌های متعددی گزارش شده‌اند از جمله روشهای کیفی qualitative :Scaning and Transmission electron microscopy 12))، روش‌های کمی مثلRadiometric assay با کربن ۱٤ (۱۲) وییاید ۱۲۵ (۱۵)، نشاندارکردن باکتری با مارکرهای فلورسان مثل PKtt26 (۹،۱۳)، شمارش باکتری‌های زنده (۱۰)، روش TLC (۵)، روش ELISA (۷،۱٤) و UPR (۷) و فلوسایتومتری (۱۳). که هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و معایبی از جهت نیاز به دستگاه‌ها و وسایل مجهز، هزینه بالا، Safety و سادگی کار و حساسیت و ویژگی روش می‌باشند در مطالعه اخیر روش UPR (۷) بعلت نسبتاً ساده بودن روش، در دسترس بودن مواد برای تهیه محلولهای لازم و قابلیت سنجش با دستگاه الیزا ریدر و حساسیت و ویژگی بالا و کمی بودن روش quantitative، برای سنجش استفاده شد.

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده تا کنون در رابطه با چسبندگی این باکتری به سلولهای کشت و موضوعات مشابه تحقیقی در ایران گزارش نشده است .ولی در کشورهای دیگر همانطور که عنوان شد در جهت ارائه سلول مناسب برای چسبیدن این باکتری، مواد مختلف برای استفاده‌های درمانی و پیشگیری از طریق ممانعت از چسبندگی و یا جداسازی باکتریهای چسبیده به سلولهای کشت تحقیقات همچنان ادامه دارد (۱۵،۱٤:۱۳،۱۲،۱۱،۱۰،۷،٦،۵). تشابهات بین چسبندگی H.pylori به سلول‌های کشت نسج و چسبندگی باکتری در Invivo اهمیت روشهای چسبندگی Adherence assay را مشخص می‌کند که می‌توانند مدل‌های مناسبی جهت تحقیق برای تعیین ادهزین‌های باکتریایی، گیرنده‌های میزبان، بررسی‌های ممانعت از چسبندگی و جداسازی باکتری از سلولها برای ارائه روش‌های جدید درمانی و پیشگیری میسر می‌سازد و روش معرفی شده در این مقاله با استفاده از سلول‌های موجود در کشورمان و همچنین سوش‌های جدا شده

Archive of SID
www.SID.ir

از بیماران در منطقه خودمان بعنوان روشی عملی و مناسب برای ای‌نگونه تحقیقات پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

از راهنمایی‌های جناب آقای دکتر امان‌زاده سرپرست کنترل کیفی آزمایشگاه بانک سلولی ایران انستیتو پاستور ایران- تهران، جناب آقای دکتر شمسی شهرآبادی و جناب آقای دکتر منوری ریاست و سوپروایزر آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی مجتمع آموزشی، پژوهشی و درمانی حضرت رسول اکرم، جناب آقای دکتر حاجتی معاونت امور مالی دانشکده پزشکی تهران، جناب آقای دکتر همایون مدیریت شرکت فرزانه آرمان و جناب آقایان مهندس تقوی نژاد و مهندس داداشی کارشناسان بخش فنی شرکت فنون آزمایشگاهی بابت کمک‌های بیدریغ و بی‌منت در جهت انجام این تحقیق نهایت سپاسگزاری را می‌نمائیم.

REFERENCES

1. DR Boone, R Castenhols. Bacteriology systemic of manual Bergey's 2 end ed. Spring 2001; 1: 161.
2. T.U. Westblom S.J. Czinn and J.G. Nedrud. Gastroduodenal Disease and Helicobacter pylori,Springer,1999.
3. Walker T. Stuart. Microbiology, Saunders text and review series, 1998, pp 169-172.
4. Mandell Gl.Bennett JE and Dolin R:Mandell,Douglas and Bennett's principles and practice of infectious Diseases, fifth ed. Churchil livingston, 2000,vol.4 pp 2285-2293.
5. Martin M. Bitzan,Benjamin D.Gold,Dana J. Philpott et all :Inhibition of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae binding to lipid receptors by bovine colostrum..The Journal of Infectious Diseases 1998; 177:955-961.
6. Hata Y, Kita T, Murakami M. Bovine milk inhibits both adhesion of Helicobacter pylori to sulfatide and Helicobacter pylori-induced vaccination of Vero cells. Diag Dis Sci 1999;44(8):1696-1702.
7. Simon PM, Goode PL, Mobasseri A and Zopf D. Inhibition of Helicobacter pylori binding to gastro intestinal epithelial cells by Sialic acid-containing oligosaccharides. Infection and Immunity 1997;Feb.:750-757.
8. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, Michael A.Pfaller, Fred C. Tenover,Robert H. Yolken. Manual of Clinical Microbiology.7 th ed.ASM press, 1999, pp.723-738.
9. Harry L.T. Mobley, George L. Mendz,Stuart L. Hazell. Helicobacter pylori, Physiology and Genectics,ASM press,2001.
10. I. Corthesy-Theulaz, N. Porta , et al. Ahesion of Helicobacter pylori to polarized T84 human intestinal cell monolayers is PH dependent. Infection and Immunity 1996;Sept:3827-3832.
11. Guzman-Murillo MA, Ruiz-Bustos E, Ho B,Ascencio F. Involvement of the heparin sulphate-binding proteins of Helicobacter pylori in its adherence to HeLa S3 and Kato III cell lines. J Med Microbiol 2001;Apr 50(4):320-329.
12. Hemalatha SG, Drumm B, Sherman P. Adherence of Helicobacter pylori to human gastric epithelial cells in vitro. J Med Microbiol 1991;Oct 35 (4):197-202.
13. Logan R.P.H, Robins A, Turner G.A et al. A Novel flow cytometric assay for quantitating adherence of Helicobacter pylori to gastric epithelial cells. Journal of Immunological Methods1998;213:19-30.
14. Hayashi S, Sugiyama T, Asaka M,Yokota K,Oguma K,Hirai Y:Modification of Helicobacter pylori adhesion to human gastric epithelial cells by antiadhesion agents.Diag Dis Sci 1998;Sep 43(9 Suppl):56S-60S.Review.
15. M.UTT,T.Wadstrom:Identification of heparin sulphate binding surface proteins of Helicobacter pylori :Inhibition of heparin sulphate binding with sulphated carbohydrate polymers.J Med Microbiol 1997;Vol 46: 541-546.

Archive of SID

www.SID.ir