

## بررسی چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به هفت رده سلول گشت شده انسانی

دکتر ناهید رحیمی فرد\*، دکتر اکبر میرصالحیان\*\*، دکتر پرویز مالک‌نژاد\*\*، دکتر ناصر ابراهیمی دریانی (دانشیار\*\*\*)  
\* متخصص میکروبیولوژی پزشکی، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی - اداره کل آزمایشگاههای کنترل غذا و دارو  
\*\* متخصص میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروبیولوژی شناسی 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 اثنی عشر در انسان و یک عامل کمکی در ایجاد سرطان معده و تومورهای لنفوییدی 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 اذعام و با تغییر آنها روش مناسب برای چسبیدن هلیکوباکتر به سلولها بدست آمد و چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیوپسی اثنی عشره با دوازدهه ۶۹ بیمار با علائم دیس پپسی، گاستریت، زخم معده، زخم اثنی عشر 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 ۵×۱۰ سلول در میلی‌لیتر، زمان ۹۰ دقیقه مجاورت باکتری با سلول در ۳۷ درجه سانتیگراد منجر به حداکثر چسبندگی شد. بین ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری از نظر چسبیدن به سلولها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. هلیکوباکتر پیلوری به تمام هفت رده سلولی مورد استفاده در شرایط *invitro* می‌چسبید 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 بیشترین 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

هلیکوباکتر پیلوری 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، زخم‌های معده و اثنی عشر و گاستریت و همچنین کارسینوژن بودن این میکروارگانیسم، درمان و یا پیشگیری از عفونت

کلمیسا آگار کشت صورت گرفت و محیطها در انکوباتور  $CO_2$  (10%) با شرایط میکروآنروفلیک بمدت ۵ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت کلنی های هلیکوباکتر پیلوری به اندازه ۱-۲ میلی متر محدب با لبه های صاف، بدون رنگ روی محیط ظاهر شدند تست های تشخیصی اکسیداز، کاتالاز، اوره از و حساسیت به سفالکسین و مقاومت به نالیدیکیک اسید و رنگ آمیزی گرم از کلنی ها انجام شد. پس از تأیید آزمایشات تشخیصی برای هلیکوباکتر پیلوری باکتری های 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 ۱، ۰/۵ و ۲ مک فارلند در PBS (به ترتیب غلظت های  $1 \times 10^6$ ،  $3 \times 10^5$ ،  $1 \times 10^4$  cfu/ml تهیه شد.

### رده های سلولی

لولهای AGS, HT29/219, HT29, Sw742, Caco-2, HepII, HeLa بانک سلولی اتستینو پاستور ایران در محیط MDME (Sigma) حاوی ۱۰٪ فتال کالف سرم پاساژ و در انکوباتور  $CO_2$  6٪ نگهداری شدند.

### آماده سازی سلولها برای آزمایش چسبندگی

۴۸ ساعت قبل از آزمایش از هر نوع سلول پس از تریسپنه کردن و تغلیظ سوسپانسیون سلولی حاوی  $5 \times 10^5$  cell/ml تهیه شد. شمارش سلولها بدنبال مخلوط ساختن آنها با رنگ کروزیل بلو ۱٪ بطور هم حجم و توسط لام نوبار صورت گرفت. سپس از سوسپانسیون سلولی برای تشکیل منولایر در چاهک های میکروپلیت (Biomat ساخت ایتالیا) ۱۰۰ میکروپلیت ریخته و تا زمان آزمایش (حداقل ۴۸ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت بعد) در انکوباتور  $CO_2$  (6٪) نگهداری شدند.

هلیکوباکتر پیلوری مورد اهمیت واقع شده است (۴-۲). از آنجا که قدم اولیه در ایجاد عفونت، چسبیدن و جایگزینی هلیکوباکتر پیلوری در مخاط معده می باشد (۶،۵). لذا اخیراً روش های درمانی جدید که از طریق ممانعت از چسبندگی این باکتری به مخاط معده است نظیر مشتقات شیر یا آغوز، عصاره های گیاهی، مواد ضد زخم و غیره پیشنهاد می شود (۵،۷،۶). جهت بررسی اثرات ضد چسبندگی این مهار کننده ها از خاصیت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری (۸،۹) به رده های سلولی مختلف در آزمایشگاه می توان بهره جست. چسبیدن هلیکوباکتر پیلوری به رده های مختلف سلولی در آزمایشگاه تحت شرایط خاصی صورت می پذیرد 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 Caco-2، HepII، AGSHeLa، HT29، HT29/219، SW742 به روش Urea Phenol Red (UPR) (۷) ابتدا سلولهای فوق را از نظر قدرت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری رده بندی تا با ارائه یک روش عملی رده سلولی مناسب از نظر چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری تعیین گردد.

### روش بررسی

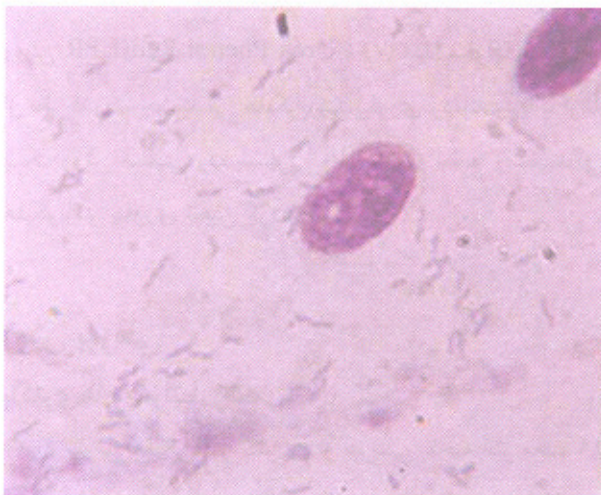
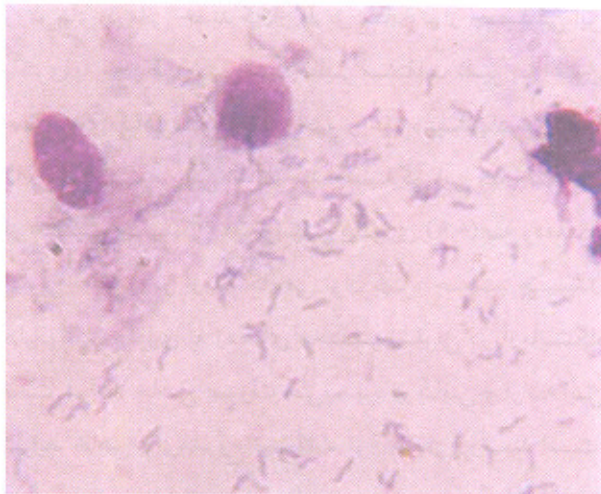
#### باکتری ها و شرایط رشد

۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری از بیوپسی ناحیه انتر معده ۴۹ بیمار مراجعه کننده جهت آندوسکوپی جدا شد روش کار به این صورت بود که ابتدا یک قطعه بیوپسی در یک میلی لیتر محیط نایوگلیکولات حاوی مکمل آنتی بیوتیکی 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 رنگ آمیزی گیمسا رنگ آمیزی شدند. تست اوره از سریع برای قطعه دیگر بیوپسی در اتاق آندوسکوپی انجام شد.

برای کشت در محیط کلمیسا قطعات بیوپسی را در هاون چینی استریل کاملاً خرد و له کرده و سریع در محسوط کشت

هلیکوباکتر پیلوری به رده‌های سلولی بهترین چسبندگی با سوسپانسیون باکتریایی معادل ۱ مک فارلند (غلظت)  $10 \times 3 \text{ cfu/ml}$  بدست آمد.



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

تمام ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری به ۷ رده سلولی مورد مطالعه چسبندگی را در عرض ۵ تا ۱۰ دقیقه نشان دادند (تصاویر ۵ و ۶).

بین ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری 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,

## آزمایش چسبندگی Attachment assay

در روز آزمایش میکروپلیت‌های حاوی منولایر سلولی سه بار با PBS شستشو شده و با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ۲۴ ساعته هلیکوباکتر پیلوری با غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۲ مک فارلند مجاورت داده شدند سپس به چند روش ۲۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در دمای محیط با حرکت روی روتاتور و ۳۰، ۱۵، ۹۰ 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 ۴۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه و ۳۰، ۱۵ و ۴۵ 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

$$\text{درصد چسبندگی} = \frac{\text{OD}_{\text{Test}} - \text{OD}_{\text{negative}}}{\text{OD}_{\text{positive}}}$$

## یافته‌ها

در اسمیرهای تماسی مربوط به بیماران آلوده با رنگ آمیزی گیمسا سلولهای اپی‌تلیال معده و تجمعی از هلیکوباکترهای خمیده دیده شد (تصاویر ۱ و ۲).

آزمایشهای اوره از سریع در اتاق اندوسکوپی برای ۴۹ بیمار انجام شد که ۲۵ تست (۵۱٪) مثبت شد (تصویر ۳). از ۴۹ کشت انجام شده ۲۲ کشت (۴۴/۸۹٪) از نظر هلیکوباکتر پیلوری مثبت بود که دارای واکنش‌های اوره از؛ اکسیداز؛ کاتالاز مثبت و مقاوم به نالیدیسیک اسید و حساس به سفالکسین بودند و در رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌ها اسپریل‌های خمیده گرم منفی مشاهده شد (تصویر ۴). در آزمایش چسبندگی

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 سالی‌فنل رد اوره و نگهداری میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور CO245 دقیقه بود. روش مناسب برای نگهداری سلول‌ها استفاده از فتال کالف سرم حاوی ۱۰٪ DMSO و برای نگهداری هلیکوباکتریلوری از فتال کالف سرم حاوی ۲۰٪ گلیسرول در پروت ۷۰- درجه سانتیگراد بود.

Caco-2، HeLa، HepII 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 ریدر، اکسیداز، اوره آز، حساسیت به سفالکسین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید

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

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of squares		
		۴۴/۷۲۹	۲۱	۹۳۹/۳۱۲	بین گروه‌ها	
۱/۰۰۰	۰/۰۷۶	۵۸۷/۰۵۳	۱۳۲	۷۷۳۵۸/۹۵۱	خارج از گروه	HEP2
			۱۵۳	۷۸۲۹۸/۲۶۲	نتیجه	
		۱۴/۹۳۷	۲۱	۳۱۲/۷۷۵	بین گروه‌ها	
۱/۰۰۰	۰/۰۷۷	۱۹۴/۲۰۱	۱۳۲	۲۵۶۳۴/۵۹۴	خارج از گروه	HELA
			۱۵۳	۲۵۹۴۸/۲۶۸	نتیجه	
		۱۴/۳۹۸	۲۱	۳۰۲/۳۵۱	بین گروه‌ها	
۰/۷۷۷	۰/۸۳۲	۱۷/۳۰۵	۱۳۲	۲۲۸۴/۲۳۶	خارج از گروه	SW742
			۱۵۳	۲۵۸۷/۵۸۷	نتیجه	
		۱۷/۲۵۴	۲۱	۳۴۱/۳۳۷	بین گروه‌ها	
۰/۹۹۸	۰/۳۲۸	۴۹/۶۰۰	۱۳۲	۶۴۹۷/۵۵۹	خارج از گروه	AGS
			۱۵۳	۶۸۳۸/۸۹۷	نتیجه	
		۱/۶۵۵	۲۱	۳۴/۷۵۹	بین گروه‌ها	
۱/۰۰۰	۰/۰۸۶	۱۹/۳۱۶	۱۳۲	۲۵۴۹/۷۲۲	خارج از گروه	HT29219
			۱۵۳	۲۵۸۴/۴۸۱	نتیجه	
		۱/۶۰۷	۲۱	۲۲/۷۲۷	بین گروه‌ها	
۱/۰۰۰	۰/۰۰۳	۵۶۹/۱۸۱	۱۳۲	۷۵۱۳۱/۸۵۲	خارج از گروه	HT29
			۱۵۳	۷۵۱۶۵/۵۸۹	نتیجه	
		۰/۳۱۱	۲۱	۶/۵۳۵	بین گروه‌ها	
۱/۰۰۰	۰/۱۸۸	۱/۶۵۵	۱۳۲	۲۱۸/۴۰۹	خارج از گروه	CACO2
			۱۵۳	۲۲۴/۹۴۴	نتیجه	

جدول شماره ۲- رده بندی سلول ها از نظر چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری

Std.Deviation	Mean	max	Min	n	
۲۲/۶۲۱۹۷	۶۷/۱۹۶۹۸	۱۰۶/۷۰۰	۱۳/۲۵۰	۱۵۴	HEP2
۱۳/۰۲۲۹	۴۱/۶۴۶۴	۶۳/۹۳	۱۰/۲۵	۱۵۴	HELA
۴/۱۱۱۷	۲۸/۵۰۰۶	۶۵/۳۲	۲۳/۱۴	۱۵۴	SW742
۶/۷۰۷۷	۱۸/۷۴۰۷	۵۰/۳۲	۷/۶۹	۱۵۴	AGS
۴/۱۱۰۰	۱۴/۷۴۹۲	۲۲/۳۰	۴/۰۰	۱۵۴	HT29219
۲/۱۶۴۸	۸/۳۳۲۴	۳/۶۳	۳/۰۱	۱۵۴	HT29
۱/۲۱۲۵	۳/۱۸۲۰	۶/۳۸	۰/۷۸	۱۵۴	CACO2
				۱۵۳	Valid N (listwise)

جدول شماره ۳- مقایسه میزان چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری در شرایط مختلف

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of squares		
۰/۰۰۰		۱۱۹۹۷/۶۲۸	۶	۷۱۹۸۵/۷۶۷	بین گروه ها	
	۲۷۹/۳۹۱	۴۲/۹۴۲	۱۴۷	۶۳۱۲/۴۹۵	خارج از گروه	HEP2
			۱۵۳	۷۸۲۹۸/۲۶۲	نتیجه	
۰/۰۰۰		۳۹۲۳/۳۹۴	۶	۲۳۵۴۰/۳۶۴	بین گروه ها	
	۲۳۹/۵۱۹	۱۶/۳۸۰	۱۴۷	۲۴۰۷/۹۰۴	خارج از گروه	HELA
			۱۵۳	۲۵۹۴۸/۲۶۸	نتیجه	
۰/۰۰۰		۱۰۹/۵۲۶	۶	۶۵۷/۱۵۴	بین گروه ها	
	۸/۲۴۵	۱۳/۱۲۵	۱۴۷	۱۹۳۹/۴۳۳	خارج از گروه	SW742
			۱۵۳	۲۵۸۶/۵۸۷	نتیجه	
۰/۰۰۰		۸۱۱/۳۱۵	۶	۴۸۶۷/۸۸۷	بین گروه ها	
	۶۰/۰۹۷	۱۳/۵۰۰	۱۴۷	۱۹۷۱/۰۰۹	خارج از گروه	AGS
			۱۵۳	۶۳۸/۸۹۷	نتیجه	
۰/۰۰۰		۴۰۳/۸۲۸	۶	۲۴۲۲/۹۶۶	بین گروه ها	
	۳۶۷/۵۳۷	۱/۰۹۹	۱۴۷	۱۶۱/۵۱۵	خارج از گروه	HT29219
		۱۲۴۹۳/۸۸۳	۱۵۳	۲۵۸۴/۴۸۱	نتیجه	
۰/۰۰۰		۱/۳۷۶	۶	۷۴۹۶۳/۲۹۵	بین گروه ها	
	۹۰۷۸/۸۸۳		۱۴۷	۲۰۲/۲۹۴	خارج از گروه	HT29
		۳۰/۰۸۹	۱۵۳	۷۵۱۶۵/۵۸۹	نتیجه	
۰/۰۰۰		۰/۳۰۲	۶	۱۸۰/۵۳۵	بین گروه ها	
	۹۹/۵۹۸		۱۴۷	۴۴/۴۱۰	خارج از گروه	CACO2
			۱۵۳	۲۲۴/۹۴۴	نتیجه	

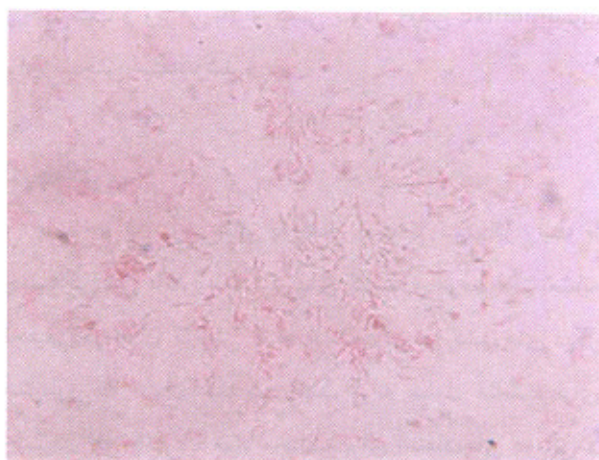
### بحث

چسبیدن باکتریهای پائوژن به سلولهای هدف یک قدم مهم در پاتوژنز باکتریهای بیماریزا است (۵،۶،۱۲).

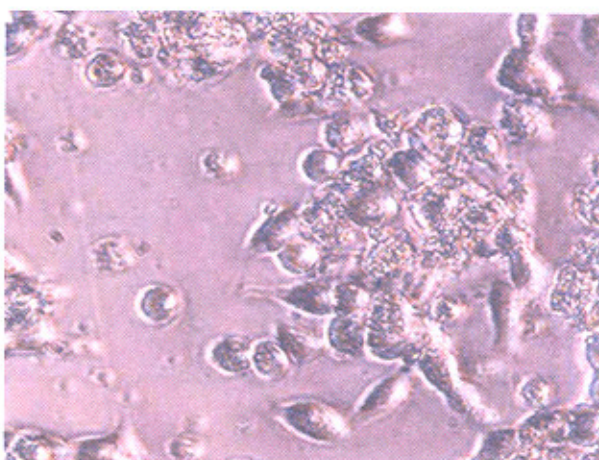
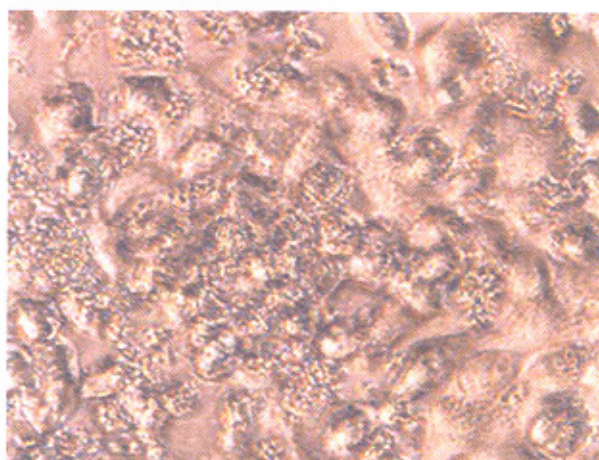
برای مثال بدنبال چسبیدن ارگانیسیم‌ها به سطوح مخاطی دستگاه گوارش بافتهای میزبان در معرض غلظتهای بیشتری از انتروتوکسینهای باکتری قرار می‌گیرند (۱۲). چسبیدن برای ورود ارگانیسیم‌ها به سلول‌های اپیتلیال نیز مهم است. بررسی‌های بافت‌شناسی از نمونه‌های بیوبسی آنتر معده انسان نشان داده که هلیکوباکتریلوری درون 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 کاملاً مشابه جراحتهایی است که در روده‌های بزرگ و کوچک باعث عفونت انتروپاتوژنیک E.coli مشاهده می‌شود (۱۲).

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

هلیکوباکتریلوری دارای آدهزینهای زیادی است از جمله LPS, Bab A, Alp A,B, HopZ, Nap, Hpa A, Hsp60, 70 core, LPS O antigen, LPS, پروتئین‌های ۱۹،۶،۲۵،۶۱،۶۳ کیلودالتونی و گیرنده‌های سلولی لوئیس N, b استیل‌نورامینیل لاکتوز (سیالیک اسید)، لاکتوزیل سرامید سولفات، لامینین، لوئیس x، موسین، هپاران سولفات و دیگر پلی ساکاریدهای سولفات، فسفاتیدیل اتانل آمین، گانگلیوتری‌اسیل سرامید، ۱... اینتگرین (۹). در این تحقیق خصوصیات چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکتریلوری به ۷ رده سلولی انسانی بررسی شد. در مطالعات زیادی چسبندگی هلیکوباکتریلوری به سلول‌های مختلف گزارش شده است از جمله: T84 توسط L.C.Theulaz و همکارانش در سال ۱۹۹۶ 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 (۶)، سلولهای HT29, HepII, AGS, Y1, HuTu-80 توسط P.M. Simon و همکارانش در سال ۱۹۹۷ از



تصویر شماره ۴- هلیکوباکتریلوری در اسمیر از کلنی رنگ‌آمیزی گرم



تصویر ۵ و ۶- هلیکوباکتریلوری چسبیده به سلول‌های کشت

و حساسیت و ویژگی بالا و کمی بودن روش quantitative. برای سنجش استفاده شد.

### نتیجه گیری

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 (۱۵-۱۰، ۷-۵). 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 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.

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 (۱۴). 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 میکروبی از  $10 \times 1$ ،  $10 \times 5$  cfu/ml متفاوت بوده است (۵، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۵). ما در غلظت  $10 \times 3$  (۱ مک 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 ۶ 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 دوازدهه 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 ۶ رده این نتیجه را تأیید می‌کند (۷). از روش‌های سنجش چسبندگی نیز روش‌های متعددی گزارش شده‌اند از جمله روش‌های کیفی *Scanning and qualitative*: (12) *Transmission electron microscopy*، روش‌های کمی مثل *Radiometric assay* با کربن ۱۴ (۱۲) و بیاید ۱۲۵ (۱۵). نشاندار کردن باکتری با مارکرهای فلورسان مثل PKtt26 (۹، ۱۳)، شمارش باکتری‌های زنده (۱۰)، روش TLC (۵)، روش ELISA (۷، ۱۴) 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

## 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. Churchill livingston, 2000, vol. 4 pp 2285-2293.
5. Martin M. Bitzan, Benjamin D. Gold, Dana J. Philpott et al. : 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, Mobasser 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 Genetics, ASM press, 2001.
10. I. Cortesy-Theulaz, N. Porta, et al. Adhesion 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 Methods 1998; 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.