

خنثی سازی سیتوتوکسیستی هلیکوباکتر پیلوری در سلولهای vero توسط امپرازول

سعید لطیفی نوید^{۱*}، دکتر فریده سیاوشی^۲، دکتر طلعت مختاری آزاد^۳، دکتر رضا ملکزاده^۴،
دکتر مسعود رضا سهرابی^۵، دکتر صادق مسرت^۴

^۱پژوهشگر، بخش میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل

^۲استادیار، بخش میکروبی شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

^۳دانشیار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۴استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۵پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

مقدمه

در این مطالعه اثر خنثی سازی امپرازول بر توکسین ایجاد کننده واکوئول (VacA)، اوره آز و حرکت باکتری بررسی گردید.

مواد و روشها

MIC امپرازول در مورد پانزده سویه هلیکوباکتر پیلوری تعیین گردید. سوپرناتانت کشت باکتریایی تغلیظ شد و همراه با غلظتهای مختلف امپرازول به سلولهای vero تلقیح گردید. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ سوپرناتانت باکتریها در بافر فسفات نمکی، همراه با اوره و امپرازول به سلولهای vero تلقیح شد. مهار ایجاد واکوئول و باروش جذب قرمز خنثی اندازه گیری شد. اثرات امپرازول بر حرکت هلیکوباکتر پیلوری در محیط نیمه جامد بروسلا آگار غنی شده با ایزوویتال - x و سرم جنین گوساله نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

MIC امپرازول ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید. تولید واکوئول در سلولهای vero، توسط سوپرناتانت کشت باکتریایی تغلیظ شده، در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر امپرازول به شدت مهار شد. امپرازول در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، از تولید واکوئول در اثر فعالیت اوره آز هلیکوباکتر پیلوری ممانعت کرد. همچنین امپرازول در غلظتهای کمتر از MIC، باعث اختلال در حرکت سویه های هلیکوباکتر پیلوری گردید.

نتیجه گیری

عقیده بر این است که امپرازول، همان طور که فعالیت پمپ پروتون سلولهای اپیتلیال معده و P-ATPase غشای سلولی هلیکوباکتر پیلوری را مختل می کند، شاید V-ATPase غشای اندولیزوزومها را که تحت تأثیر VacA فعال می گردد، نیز مهار کند. نتایج این مطالعه نشان داد که امپرازول ایجاد واکوئول توسط VacA هلیکوباکتر پیلوری، فعالیت اوره آز و حرکت باکتری را مختل می کند. بنابراین این دارو نه تنها به عنوان یک مهارکننده پمپ پروتونی سلولهای اپیتلیال، در جهت درمان بیماریهای گوارشی مفید واقع می شود، بلکه دارای اثرات ضد باکتریایی علیه هلیکوباکتر پیلوری می باشد. گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۸-۱۶۱

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، امپرازول، مهار، vacA، اوره آز، حرکت

مقدمه

شده و بازدارنده پمپ پروتونی در غشای سلولهای اپیتلیال است. همچنین امپرازول با اتصال کووالان به گروههای تیول موجود در غشای سلولی هلیکوباکتر پیلوری، از فعالیت P-ATPase (Proton-Pump) ممانعت می کند. P-ATPase که در غشای سلولی هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، شبیه پمپ پروتونی سلولهای اپیتلیال معده است و در باکتریها به طور معمول وجود ندارد^(۳). یک ویژگی مهم هلیکوباکتر پیلوری تولید سیتوتوکسین ایجادکننده واکوئول (Vacuolating Cytotoxin A, VacA) است که ثابت شده در استقرار باکتری در مخاط معده و بروز بیماریهای مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری نقش مهمی ایفا می کند^(۴،۵). به نظر

برای ریشه کن کردن هلیکوباکتر پیلوری از رژیمهای درمانی مختلف استفاده می شود که در اکثر آنها یک مهارکننده پمپ پروتونی (Proton Pump Inhibitor, PPI) مانند امپرازول و یا لانزوپرازول وجود دارد^(۱،۲). امپرازول، یک بنزوازیدامیدازول جایگزین

* نویسنده مسئول: سعید لطیفی نوید - اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی

اردبیل، دانشکده علوم پزشکی، بخش میکروبی شناسی
تلفن: ۰۴۵۱ ۳۳۳۱۰۹۹ نامبر: ۶۱۱۱۲۴۶۰۰

E-mail: slatifi@khayam.ut.ac.ir

رنگ آمیزی گرم، و مثبت بودن آزمونهای اکسیداز، کاتالاز، و اوره آز
تأیید شد.

تعیین MIC امپرازول

حساسیت سویه های هلیکوباکتر پیلوری نسبت به امپرازول (UQUIFA, Spain) با روش agar dilution^(۱۳)، بررسی شد. امپرازول در اتانول حل شده، در داخل بروسلا آگار (Merck, Germany)، حاوی ۵٪ خون در غلظتهای متوالی ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر، ریخته شد. از کشت تازه باکتریها، سوسپانسیون در بروسلا برات (Oxoid, USA)، با کدورت 3×10^8 باکتری در میلی لیتر تهیه شد. پنجاه میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری روی بروسلا آگار حاوی امپرازول ریخته شد. و پلیت ها در شرایط ذکر شده گرمخانه گذاری شدند. پس از ۵ روز، کمترین غلظت امپرازول که رشد باکتریها را مهار می کرد به عنوان (Minimal Inhibitory Concentration) MIC امپرازول تعیین شد.

استخراج و تغلیظ VacA

سویه های هلیکوباکتر پیلوری در محیط بروسلا برات، حاوی ۵٪ سرم جنین گاو (Sigma, USA)، در 37°C ، ۵٪ CO_2 با حرکت دورانی (۱۰۰ دور در دقیقه) کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت سوسپانسیون های باکتریایی به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند و سوپرناتانت (مایع رویی) آنها در 20°C ذخیره شدند. برای تغلیظ VacA، سوپرناتانت باکتریها توسط سولفات آمونیوم اشباع شده (۵۰٪) رسوب داده شده، تغلیظ شدند. رسوبهای تغلیظ شده در بافر فسفات نمکی (Buffer Salin, PBS) (Phosphat) حل و توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. از توکسین های تغلیظ شده، با استفاده از محیط کشت سلول (Modified Eagle's Minimal Essential Medium, MEM, Sigma, USA) رقت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰ و ۱۲۸۰ تهیه شد و برای بررسی بعدی مورد استفاده قرار گرفت^(۱۴).

کشت سلولهای vero

برای کشت سلولهای vero (Pasteur Institute, France) از محیط MEM واجد ۱۰٪ سرم جنین گاو استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در 37°C ، سلولهای چسبیده به سطح صاف ظرف کشت، توسط تریپسین جدا شدند و در محیط MEM به حالت سوسپانسیون در آمدند. سوسپانسیون سلولی در داخل چاهکهای میکروپلیت ۹۶ چاهکی (NUNC TM, Denmark) با کدورت 3×10^3 سلول در هر چاهک توزیع شد. سپس برای تشکیل تک لایه سلولی، میکروپلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در 37°C گرمخانه گذاری شدند.

می رسد که VacA باعث فعال شدن V-ATPase (vacuolar-type) در سلولهای اپیتلیال و افزایش میزان واکوئول و در نتیجه مرگ سلولها می شود^(۶). در این ارتباط اگر امپرازول توانایی مهار فعالیت پمپ V-ATPase را داشته باشد ممکن است بتواند از تشکیل واکوئول در سلولهای اپیتلیال معده، ممانعت کند.

اوره آز یک عامل بیماریزایی مهم هلیکوباکتر پیلوری است که در استقرار باکتری در مخاط معده و ایجاد زخم نقش دارد. اوره آز هلیکوباکتر پیلوری نقش مهمی در چسبیدن باکتری به سلولهای اپیتلیال و تحریک مرگ برنامه ریزی شده دارد^(۷،۸). اوره آز هیدرولیز اوره به آمونیاک و کربامات را کاتالیز می کند. آمونیاک حاصل موجب تشکیل واکوئول در سلولهای اپیتلیال معده می شود^(۹). همچنین آمونیاک تولید شده به واسطه ترکیب با کلر و تشکیل مونوکلرآمین، مرگ سلولی را در سلولهای اپیتلیال القا می کند^(۱۰). بنابراین مهار فعالیت اوره آز در جلوگیری از بیماریزایی این باکتری مهم است.

در بسیاری از باکتریهای بیماریزا، حرکت وابسته به تاژک و کموتاکسی، عوامل حیاتی برای استقرار در میزبان و ایجاد عفونت پایدار می باشند. مطالعات نشان می دهند که حرکت، نقشی کلیدی در استقرار هلیکوباکتر پیلوری در مخاط معده انسان دارد^(۱۱)؛ بنابراین مهار حرکت منجر به اختلال در استقرار و بیماریزایی هلیکوباکتر پیلوری می شود.

در این تحقیق، میزان توانایی سویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران با عوارض گوارشی مختلف، در ایجاد واکوئول در سلولهای کشت شده vero و تأثیر امپرازول در خنثی کردن این فرآیند؛ همچنین اثر امپرازول بر حرکت و فعالیت اوره آز هلیکوباکتر پیلوری بررسی شد.

مواد و روشها

سویه های باکتریایی

در این مطالعه مقطعی، پانزده سویه هلیکوباکتر پیلوری برای بررسی اثر مهارکنندگی امپرازول استفاده شدند. این سویه ها از نمونه های بیوپسی معده و مری بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان دکتر شریعتی تهران جدا شدند. ۵ نفر از این بیماران گاستریت، ۳ نفر زخم دوازدهه، ۱ نفر زخم معده، ۳ نفر سرطان معده و ۳ نفر زخم بارت داشتند. نمونه های بیوپسی در داخل محیط ترانسپورت به آزمایشگاه منتقل و روی محیط بروسلا آگار حاوی ۵٪ خون دفیبرینه، وانکومایسین ۱۰ میلی گرم در لیتر، پلی میکسین B ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر، تری متوپریم ۵ میلی گرم در لیتر و آمفوتریسین B ۲ میلی گرم در لیتر، کشت داده شدند. پلیت ها در شرایط کم هوای (۵٪ CO_2)، و دمای 37°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری شدند. هویت باکتریها با

و FBS ۲ درصد)، به چاهکها اضافه شد. سلولها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از نظر وجود واکوئول‌های درون سیتوپلاسمی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. شدت واکوئولاسیون با استفاده از روش جذب قرمز خنثی که قبلاً ذکر شد، تعیین گردید^(۹،۱۴). آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین تراکم نوری محاسبه گردید. سلولهای تلقیح شده با عصاره‌های باکتریایی به تنهایی، غلظتهای مختلف امپرازول به تنهایی و سلولهای تلقیح نشده حاوی محیط کشت نگهدارنده، به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره آبی حاوی آنزیم اوره‌آز

از کشت تازه باکتریها سوسپانسیونی در ۲ میلی لیتر در PBS تهیه شد. کدورت نمونه‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر در حدود ۰/۶ تنظیم شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی برای ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۴°C) شدند. رسوبهای باکتریایی در آب مقطر به حالت سوسپانسیون در آمدند و به مدت ۶۰-۴۵ ثانیه با دستگاه ورتکس (vortex) به شدت تکان داده شدند. سلولهای باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ (۱۰/۰۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه، ۴°C) رسوب داده شدند. مایع رویی باکتریها از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند و در ۲۰°C ذخیره گردیدند^(۱۵).

مهار ایجاد واکوئول توسط آنزیم اوره‌آز، با امپرازول

۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز سویه‌های باکتریایی (با میانگین فعالیت ویژه $2 \times 10^{-2} \mu\text{mol urea/min/OD}$)، ۱۰ میلی مولار اوره و غلظتهای مختلف امپرازول (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به سلولهای vero در محیط کشت نگهدارنده اضافه گردیدند. مهار ایجاد واکوئول توسط آنزیم اوره‌آز توسط روش جذب رنگ قرمز خنثی که قبلاً ذکر شد، بررسی گردید. سلولهای تلقیح شده با سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری به تنهایی، امپرازول به تنهایی، اوره به تنهایی و سلولهای تلقیح نشده حاوی محیط کشت نگهدارنده، به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند^(۱۶).

اثر مهارکنندگی امپرازول روی حرکت باکتری

مهار حرکت در محیط نیمه جامد حاوی بروسلابرات، ۰/۳۵ درصد آگار، ۱٪ مکمل ایزوویتال - x و ۱۰٪ سرم غیر فعال شده جنین گاو و غلظتهای زیر MIC امپرازول ($\frac{1}{4}$ ، $\frac{1}{8}$ و $\frac{1}{16}$) بررسی گردید. یک لوپ از کشتهای ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی، به اندازه دو

بررسی وجود Vaca و تعیین غلظت ایجاد کننده واکوئول در سلولهای کشت شده vero

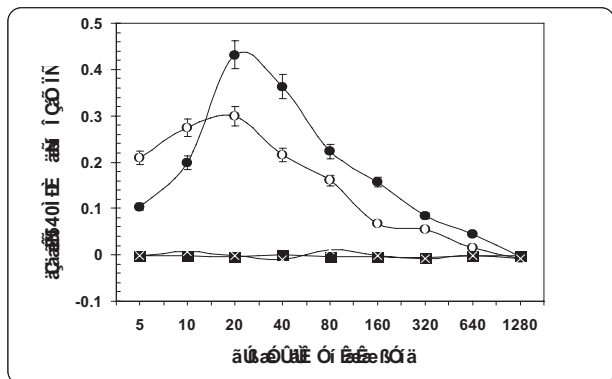
برای بررسی وجود Vaca و تعیین غلظت ایجاد کننده واکوئول، میکروپلیت‌های حاوی سلولهای vero به کار گرفته شدند. محیط کشت داخل چاهکها خارج شد و به جای آن محیط کشت نگهدارنده به همراه رفتهای مختلف سوپر ناتانت کشت تغلیظ شده سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، شدت واکوئولاسیون با استفاده از روش جذب رنگ قرمز خنثی تعیین شد^(۹،۱۴). به طور خلاصه، محیط داخل چاهکها خالی و داخل هر یک از آنها ۱۰۰ میکرولیتر از قرمز خنثی ۵٪ در محیط MEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو ریخته شد. بعد از ۴ دقیقه، سلولها ۲ بار با ۱۵۰ میکرولیتر آب نمک ۰/۹ درصد شست و شو داده شدند. قرمز خنثی جذب شده در داخل سلولها با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید-الکل (۷۰ میلی لیتر اتانول، ۲۹ میلی لیتر آب مقطر، ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال) خارج شد و تراکم رنگ با استفاده از الایزایدرا^۱ در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این رنگ، توسط واکوئول‌های سلولهای زنده جذب می‌شود و هر چه میزان جذب قرمز خنثی بیشتر باشد، به همان نسبت تراکم واکوئول‌های تشکیل شده و در نتیجه میزان جذب نوری خالص (net Optical Density, nOD) در طول موج ۵۴۰ نانومتر بالاتر خواهد بود. بالاترین رقت عصاره‌های باکتریایی که توانایی ایجاد واکوئول در بیش از ۵۰٪ سلولهای vero را بعد از ۲۴ ساعت داشت، به عنوان تیترا ایجاد کننده واکوئول تعیین شد. آزمایش در مورد هر یک از رفتهای توکسین تغلیظ شده از سویه‌های مختلف، سه بار تکرار شد. میانگین جذب نوری چاهکهای محتوی سلولهای گرمخانه‌گذاری شده با محیط به تنهایی^(۰/۱۴۰±۰/۰۰۹)، از میانگین جذب نوری هر یک از چاهکهای گرمخانه‌گذاری شده با سیتوتوکسین تفریق شد و نتایج به صورت میانگین جذب نوری خالص بیان گردید. سپس منحنی مربوط به آن رسم شد. بررسیهای میکروسکوپی نیز با استفاده از میکروسکوپ نوری (×۴۰) انجام شد.

خنثی سازی سیتوتوکسیسیتهی (ایجاد واکوئول) سویه‌های مختلف

هلیکوباکتر پیلوری روی سلولهای vero توسط امپرازول

به منظور ایجاد واکوئول در اکثر سلولهای کشت شده، عصاره‌های باکتریایی به میزان دو برابر تیترا ایجاد کننده واکوئول به چاهکهای میکروپلیت‌ها اضافه شدند. امپرازول در غلظتهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به همراه محیط کشت نگهدارنده (MEM

زخم دوازدهه، یک نمونه از زخم معده، سه نمونه از زخم بارت و سه نمونه از سرطان معده) به ترتیب ۰/۱۰۳، ۰/۱۹۹، ۰/۴۳۲، ۰/۳۶۳، ۰/۲۲۳، ۰/۱۵۷، ۰/۰۸۴، ۰/۰۴۵ و ۰/۰۰۴- بود (شکل ۱).



شکل ۱: القای جذب قرمز خنثی در سلولهای Vero توسط سیتوتوکسین دو گروه هلیکوباکتر پیلوری (HP)

گروه اول، شامل پنج سویه جدا شده از بیماران گاستریت (○) و گروه دوم، شامل ده سویه جدا شده از بیماران مبتلا به زخم و سرطان معده (●). سوپرناتانت کشت تغلیظ شده هلیکوباکتر پیلوری غیرسیتوتوکسیک جدا شده از نمونه گاستریت (■)؛ همچنین سلولهای تلقیح شده با محیط کشت باکتریایی تغلیظ شده به تنهایی (⊗)، به عنوان شاهد استفاده شده است.

بررسی مهار تشکیل واکوئول با روش جذب قرمز خنثی نشان داد که امپرازول در غلظت ۵۰ μg/ml، باعث کاهش شدید میزان واکوئول در هر یک از گروههای گاستریت، زخم و سرطان می شود و اثرات مخرب سیتوتوکسین را مهار می کند؛ به طوری که در این غلظت کاهش شدید در میانگین جذب خالص قرمز خنثی مشاهده می شود ($p < 0.05$). میانگین جذب خالص قرمز خنثی در گروه گاستریت در حضور توکسین بدون امپرازول (شاهد)، ۰/۲۷۰ بود که با اضافه شدن امپرازول در غلظتهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، این میزان به ترتیب به ۰/۲۵۰، ۰/۱۹۵، ۰/۰۴۶، ۰/۰۲۲ و ۰/۰۵۶- کاهش یافت. همچنین میانگین جذب خالص قرمز خنثی در گروه زخم و سرطان در حضور توکسین بدون امپرازول (شاهد)، ۰/۲۰۱ بود که با اضافه شدن امپرازول در غلظتهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر این میزان به ترتیب به ۰/۱۸۱، ۰/۱۵۵، ۰/۰۴۲، ۰/۰۳۲ و ۰/۰۵۹- کاهش یافت. امپرازول به تنهایی در غلظتهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر تأثیری بر روی رشد سلولها و میزان جذب قرمز خنثی نداشته است؛ اما در غلظت ۱۰۰ μg/ml، جذب نوری خالص به ۰/۰۶۹- رسید و مهار رشد سلولهای vero مشاهده شد (شکل ۲). همچنین مشاهدات میکروسکوپی نیز کاهش تراکم واکوئولها در غلظت ۵۰ μg/ml تأیید کرد (شکلهای ۳A، ۳B و ۳C).

میلی متر در داخل آگار فرو برده شد و رگه ای به طول چهار سانتی متر ایجاد شد. پلیت ها در حالتی که در آنها رو به بالا بود، در شرایط کم هوای و ۳۷°C، به مدت پنج روز، گرمخانه گذاری شدند و حرکت باکتریها به صورت انتشار دو طرفه از ناحیه تلقیح، بررسی گردید. برای کنترل، آگار نیمه جامد بدون امپرازول تلقیح شد. آزمایش در مورد هر یک از نمونه ها دو بار تکرار شد (۱۶).

روشهای آماری

نتایج به صورت میانگین جذب نوری خالص بیان شده (mean net OD ± SEM, Standard Error of Mean) و آنالیز با استفاده از آزمون t (student t test) برای متغیرهای مستقل انجام شده است.

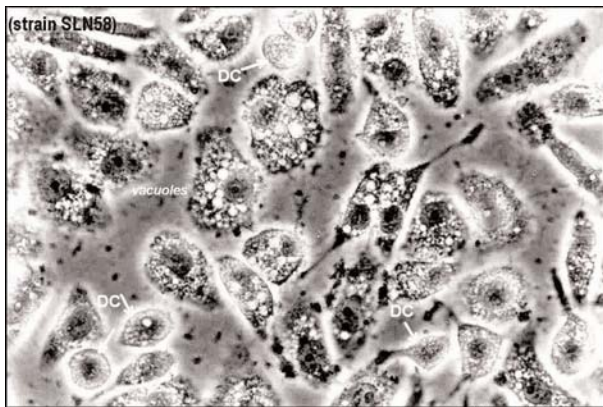
نتایج

MIC امپرازول برای سویه های مورد آزمایش ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد.

سلولهای گرمخانه گذاری شده با رفتهای کمتر از ۱۲۸۰ سوپرناتانت کشت تغلیظ شده تمام سویه های جدا شده از گاستریت، زخم و سرطان به طور معنی داری جذب بالای قرمز خنثی را نسبت به گروه شاهد داشتند ($p < 0.05$ در تمام موارد)، از این رو تمام سویه ها سیتوتوکسین مثبت بودند. در تمام نمونه ها، رفتهای کمتر از ۱۲۸۰ سیتوتوکسین باعث پارگی و انهدام اکثر سلولها شده بود و میزان جذب قرمز خنثی به طور معنی داری پایین بود. رقت ۱۲۸۰ سیتوتوکسین سویه های مختلف هلیکوباکتر پیلوری به عنوان رقت ایجادکننده واکوئول (بالاترین رقت عصاره باکتریایی که باعث تشکیل واکوئول در ۵۰٪ یا بیشتر سلولها، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری می شود) تعیین گردید. با آنکه رقت ۱۲۸۰ در مورد سیتوتوکسین تمام سویه های جدا شده از بیماران به دست آمد، اما میزان جذب قرمز خنثی و شدت تشکیل واکوئول در این رقت و رفتهای دیگر بین سویه های مختلف تفاوت فاحشی داشت. سیتوتوکسین سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم، سرطان معده و زخم بارت، میزان جذب قرمز خنثی و شدت تشکیل واکوئول بیشتری را نسبت به سیتوتوکسین تغلیظ شده سویه های جدا شده از موارد گاستریت نشان داد ($p < 0.05$ در تمام رفتهای کمتر از ۱۲۸۰)، به طوری که میانگین جذب خالص قرمز خنثی در رفتهای مختلف توکسین (۱۲۸۰، ۶۴۰، ۳۲۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵) در گروه گاستریت به ترتیب ۰/۲۰۹، ۰/۲۷۴، ۰/۳۰۰، ۰/۲۱۶، ۰/۱۶۱، ۰/۰۶۷، ۰/۰۵۴، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۸- و در گروه زخم و سرطان معده (سه نمونه از



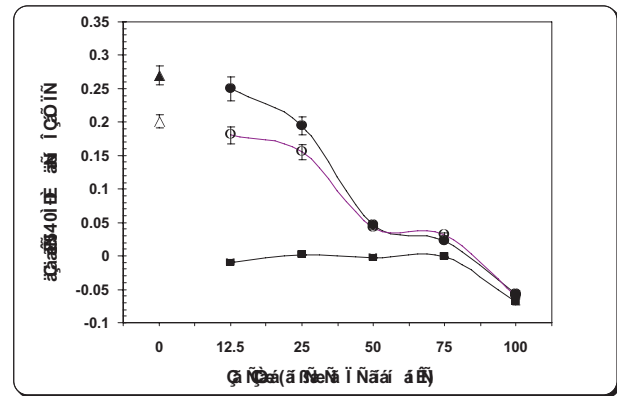
شکل ۲A: سلولهای vero کشت شده در محیط MEM (بزرگنمایی ۴۰۰)



شکل ۲B: تیمار سلولهای vero، با سیتوتوکسین هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از یک بیمار مبتلا به سرطان معده
تأثیر شدید به صورت تشکیل واکوئول‌های زیاد، دیده می‌شود. سلولهای مرده و کنده شده (DC, Dead Cell) نیز با پیکان مشخص شده‌اند (بزرگنمایی ۴۰۰).



شکل ۲C: تیمار سلولهای vero با سیتوتوکسین هلیکوباکتر پیلوری و امپرازول (۵۰ $\mu\text{g/ml}$)
کاهش میزان واکوئول در مقایسه با شاهد (۲B) کاملاً مشخص است (بزرگنمایی ۴۰۰).



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف امپرازول بر جذب قرمز خنثی توسط سلولهای vero تیمار شده با سیتوتوکسین دو گروه هلیکوباکتر پیلوری (HP) سلولهای vero به مدت ۲۴ ساعت با سیتوتوکسین HP (گروه گاستریت) به تنهایی (▲) و همراه با امپرازول (●)، سیتوتوکسین HP (گروه زخم و سرطان) به تنهایی (△) و همراه با امپرازول (○)، و همچنین امپرازول در غلظت‌های مختلف به تنهایی (■) گرمخانه‌گذاری شده بودند.

اثر مهارکنندگی امپرازول بر تشکیل واکوئول توسط اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری، به صورت میکروسکوپی و توسط روش جذب قرمز خنثی بررسی شد. نتایج نشان داد که امپرازول در غلظت‌های مختلف باعث مهار تشکیل واکوئول ایجاد شده توسط آنزیم اوره‌آز سویه‌های مختلف شده است، به طوری که اثر مهارکنندگی در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ ، به بالاترین میزان خود می‌رسد. مشاهدات میکروسکوپی نیز کاهش شدید تراکم واکوئول‌ها را در این غلظت تأیید کرد. جذب خالص قرمز خنثی در طول موج 540 nm در حالتی که سلولها با سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز و اوره، گرمخانه‌گذاری شده بودند به طور میانگین در 15 سویه هلیکوباکتر پیلوری 0.258 بود که پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف امپرازول، 0.125 ، 0.25 ، 0.50 ، 0.75 و 1.00 میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب به 0.168 ، 0.048 ، 0.009 ، 0.003 و 0.056 کاهش یافت. امپرازول به تنهایی در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ ، باعث مهار رشد سلولهای vero شد. میانگین جذب خالص قرمز خنثی در حضور اوره به تنهایی و همچنین در حضور سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز به تنهایی به ترتیب 0.14 و 0.05 بود که نشان می‌داد اوره‌آز و اوره به تنهایی توانایی ایجاد واکوئول در سلولهای vero ندارند (شکل ۴).

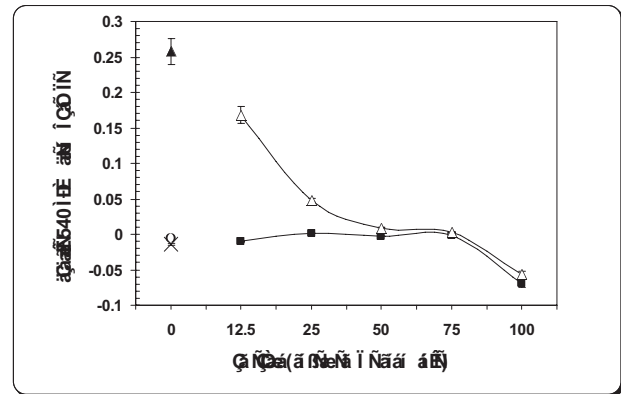
امپرازول در غلظت‌های زیر MIC ($\frac{1}{8}$ ، $\frac{1}{4}$ ، $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{16}$) به طور مؤثری از حرکت تمام سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در آگار نیمه جامد جلوگیری کرد، در حالی که در آگار نیمه جامد بدون امپرازول (شاهد)، حرکت باکتریها به صورت انتشار دو طرفه از ناحیه تلقیح مشاهده شد.

توسط VacA و تخریب آنها ممانعت نمود. این تأثیر می‌تواند به دلیل ایجاد اختلال در فعالیت V-ATPase و یا مسدود شدن گیرنده‌های مربوط به VacA روی سلولهای vero توسط امپرازول باشد. با توجه به اینکه سلولها ممکن است از نظر دارا بودن و نوع گیرنده VacA متفاوت باشند، بنابراین شاید تفاوت نتایج به دلیل تفاوت در اجزای سطحی سلول باشد.

برای بسیاری از باکتریهای بیماریزا، حرکت وابسته به تاژک و کموتاکسی از عوامل حیاتی برای استقرار در میزبان و ایجاد عفونت پایدار است. مطالعات نشان داده‌اند که تاژکهای هلیکوباکتر پیلوری، نقش کلیدی در استقرار باکتری در مخاط معده انسان دارند (۱۱،۲۴). نتایج این مطالعه نشان داد که امپرازول در غلظتهای زیر MIC به طور مؤثری حرکت سوبیه‌های هلیکوباکتر پیلوری را مهار می‌کند. این تأثیر می‌تواند به دلیل مهار P-ATPase هلیکوباکتر پیلوری و فقدان انرژی لازم برای حرکت تاژکهای باکتری باشد (۳).

امپرازول، باعث مهار ایجاد واکوئول در سلولهای vero توسط سوپرناتانت حاوی اوره‌آز شد. میرشاهی و همکاران نیز نشان دادند که امپرازول با مهار فعالیت اوره‌آز، موجب ایجاد مهار رشد و توقف تکثیر هلیکوباکتر پیلوری می‌گردد. امپرازول توانایی مهار اوره‌آز پروتئوس میرابیلیس، پروتئوس ولگاریس و پروویدنسیا رتاگری را ندارد، اما می‌تواند فعالیت اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری را مهار کند (۲۵). اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری شامل دو یون نیکل و یک واحد سیستئین در جایگاه فعال خود می‌باشد. امپرازول با اتصال کووالان به واحد سیستئین، آن را تغییر می‌دهد و باعث مهار فعالیت اوره‌آز می‌شود (۲۶). نتایج این مطالعه نشان داد امپرازول، که برای کاهش میزان ترشح اسید و بهبود عوارض گوارشی برای بیماران تجویز می‌گردد، داروی مؤثری در خنثی کردن عوامل بیماریزایی هلیکوباکتر پیلوری مثل VacA، اوره‌آز و حرکت است. خنثی شدن اثرات VacA باکتری توسط امپرازول ممکن است به دلیل هدف قرار دادن V-ATPase در غشای اندوزوم و یا چسبیدن به گیرنده VacA در سطح سلول باشد. همچنین امپرازول با مهار P-ATPase هلیکوباکتر پیلوری، باعث فقدان انرژی لازم برای حرکت تاژک می‌شود. امپرازول با اتصال به جایگاه فعال اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری، آن را تغییر می‌دهد و باعث مهار فعالیت این آنزیم می‌شود.

شایان ذکر است که این مقاله، در پانزدهمین کنگره بین‌المللی آسیب‌شناسی معدی-روده‌ای و هلیکوباکتر پیلوری (آتن - یونان، ۱۴-۱۱ سپتامبر ۲۰۰۲) ارائه شد (۲۷).



شکل ۴: اثر غلظتهای مختلف امپرازول بر جذب قرمز خنثی توسط سلولهای vero تیمار شده با سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز سوبیه‌های هلیکوباکتر پیلوری و اوره بدون امپرازول (▲)، امپرازول (Δ)، سلولهای تلقیح شده با اوره‌آز به تنهایی (○) و اوره به تنهایی (○) و همچنین امپرازول به تنهایی (■)

بحث

مهارکننده‌های پمپ پروتونی مانند امپرازول و لانزوپرازول که نقش عمده آنها ممانعت از ATPase غشای سلولهای اپیتلیال و کاهش ترشح اسید است علیه گونه‌های مختلف هلیکوباکتر، به ویژه هلیکوباکتر پیلوری اثر مهارکنندگی دارند (۱۷،۱۸). این تأثیرات ممکن است بر سیتوتوکسین (VacA) هلیکوباکتر پیلوری اعمال شوند، زیرا این سیتوتوکسین فعال که در اکثر سوبیه‌های هلیکوباکتر پیلوری تولید می‌شود، با برخی از ATPase‌هایی که جریان یون‌ها از طریق غشاهای سلولی را تنظیم می‌کند، شباهت دارد (۱۹). Papini و همکاران نشان دادند که VacA با ایجاد کانالهایی در غشای پلاسمایی موجب تحریک V-ATPase که یک نوع پمپ پروتونی در غشای لیزوزوم و اندوزوم است، می‌شود (۱۴). ورود VacA به درون سلول از طریق اندوسیتوز وابسته به گیرنده انجام می‌شود (۲۰). یکی از گیرنده‌های شناخته شده، RPTPβ (Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase β) است که با چسبیدن به آن باعث ایجاد کانال در غشای سلول می‌شود (۲۱). ایجاد این کانال باعث ورود آنیون‌ها به داخل اندوزوم تشکیل شده می‌شود و باعث افزایش فعالیت V-ATPase می‌گردد. این امر منجر به ورود پروتون به اندوزوم و تجمع بازهای ضعیف و در نتیجه تشکیل واکوئول به واسطه ورود آب می‌شود. با افزایش محتویات آب، واکوئول‌ها بزرگ می‌شوند و در نهایت مرگ سلول رخ می‌دهد (۲۲،۲۳،۱۴).

Figura و همکاران نشان دادند که امپرازول توانایی مهار تشکیل واکوئول القا شده توسط سیتوتوکسین هلیکوباکتر پیلوری را در سلولهای هلا (Hela) ندارد (۱۶). در این مطالعه، امپرازول با غلظت ۵۰ µg/ml به طور مؤثری از تشکیل واکوئول در سلولهای vero

واژه‌نامه

قرمز خنثی: رنگی است که توسط واکوئول‌های سلولهای زنده جذب می‌شود.

P-ATPase: یک نوع پمپ پروتون شبیه پمپ پروتون سلولهای اپیتلیال معده است که در غشای سلولی هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و فعالیت آن، با امپرازول مهار می‌شود.
آپوپتوز: نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که به‌طور طبیعی در برخی از سلولهای بدن صورت می‌گیرد.

(Modified Eagle's Minimal Essential Medium) MEM: محیطی بسیار غنی از اسیدهای آمینه است که بعد از اضافه شدن گلوتامین، بی‌کربنات سدیم و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین، کانامایسین، و آمفوتریسین B) به‌عنوان محیط کشت سلول vero و با سلولهای دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

(Fetal Bovine Serum) FBS: سرم جنین گاو که همراه با محیط کشت MEM برای کشت سلول vero استفاده می‌شود و در چسبیدن سلولها به سطح ظرف کشت و رشد و تکثیر آنها کمک می‌کند.

(vacuolar-type) V-ATPase: نوعی پمپ پروتون در غشای اندوزوم-لیزوزومها (اندولیزوزوم) است که توسط VacA، فعال می‌شود و موجب ایجاد واکوئول در سلولهای اپیتلیال می‌گردد.

(Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase β) RPTP β : پروتئین گیرنده‌ای ۲۵۰ کیلودالتونی (تیروزین فسفاتاز B) در سطح برخی از سلولهای اپیتلیال است که VacA مونومر یا اولیگومر به آن متصل شده و با تحریک V-ATPase موجب ایجاد واکوئول می‌شود.

امپرازول (Proton Pump Inhibitors, PPIs): بازدارنده پمپ پروتون است که موجب کاهش تولید اسید از سلولهای کناری معده می‌شود. همچنین موجب مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط *in vitro* و *in vivo* می‌شود.

(Vacuolating Cytotoxin A) VacA: توکسین ایجادکننده واکوئول که در سطح هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و نیز توسط این باکتری به محیط ترشح می‌شود. این توکسین با تحریک فعالیت الکتروژنیک پمپ V-ATPase در سطح اندوزوم و لیزوزوم موجب ایجاد واکوئول در سلولهای اپیتلیال و مرگ سلولی می‌شود. همچنین از الحاق فاگوزوم-لیزوزوم و انهدام سلول باکتریایی در فاگولیزوزوم ماکروفاژها ممانعت می‌کند و همچنین با حذف سیتوکروم C از سیستم انتقال الکترونی باعث القای خودکشی سلولی می‌شود. پروتئین VacA از دو بخش، پپتید نشانه (signal, s) و بخش میانه (middle, m) تشکیل شده است که هر کدام به‌صورت s1 (با زیرمجموعه s1a و s1b، s1c، s2، s1a و s1b) تقسیم‌بندی شده‌اند. به نظر می‌رسد که نوع s1/m1 میزان توکسین بیشتری تولید می‌کند؛ اما نوع s1/m2 توکسین کمتری تولید می‌کند و میزان توکسین تولید شده توسط نوع s2/m2 خیلی کم یا هیچ است. از آنجا که اکثر سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری از نوع VacA s1، CagA مثبت نیز می‌باشند، وجود هر دو پروتئین به‌عنوان شاخص بیماریزایی باکتری مطرح است.

Vero cells: سلولهای اپیتلیال کلیه میمون سبز آفریقایی (*Cercopithecus aethiops*) می‌باشند که توانایی چسبیدن به ظرف کشت و تکثیر در شرایط *in vitro* را دارند.

مراجع

- Roghani HS, Massarrat S, Shirekhoda M, Butorab Z. Effect of different doses of Furazolidone with amoxicillin and omeprazole on eradication of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; **18**: 778-82.
- Yang KC, Wang GM, Chen JH *et al.* Comparison of rabeprazole-based four- and seven-day triple therapy and omeprazole-based seven-day triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients with peptic ulcer. *J Formos Med Assoc* 2003; **102**: 857-62.
- Sjostrom JE, Kuhler T, Larsson H. Basis for the selective antibacterial activity in vitro of proton pump inhibitors against *Helicobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1797-801.
- Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y *et al.* The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; **173**: 1171-5.
- de Bernard M, Cappon A, Del Giudice G *et al.* The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2004; **293**: 589-97.
- Tombola F, Oregna F, Brutsche S *et al.* Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 1999; **460**: 221-5.
- Fan X, Gunasena H, Cheng Z *et al.* *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* 2000; **165**: 1918-24.
- Segal ED, Lange C, Covacci A *et al.* Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 7595-9.
- Cover TL, Puryear W, Perez-Perez GI *et al.* Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter*

- pylori cytotoxin. *Infect Immun* 1991; **59**: 1264-70.
10. Suzuki H, Mori M, Suzuki M *et al.* Extensive DNA damage induced by monochloramine in gastric cells. *Cancer Lett* 1997; **115**: 243-8.
 11. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1992; **37**: 123-7.
 12. Annear DI, Norcott TC, Ruhen RB. The agar dilution method of testing the sensitivity of bacteria to antibiotics. *Pathology* 1974; **6**: 45-52.
 13. Leunk RD, Johnson PT, David BC *et al.* Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; **26**: 93-9.
 14. Papini E, Bugnoli M, De Bernard M *et al.* Bafilomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells. *Mol Microbiol* 1993; **7**: 323-7.
 15. Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI *et al.* Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 9464-9.
 16. Figura N, Armellini D, Bugnoli M *et al.* Activity of omeprazole on *Helicobacter pylori* and relation to toxicity of strains. *J Clin Pathol* 1994; **47**: 440-2.
 17. Alarcon T, Domingo D, Sanchez I *et al.* In vitro activity of ebrotidine, ranitidine, omeprazole, lansoprazole, and bismuth citrate against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17**: 275-7.
 18. Vogt K, Hahn H. Bactericidal activity of lansoprazole and omeprazole against *Helicobacter pylori* in vitro. *Arzneimittelforschung* 1998; **48**: 694-7.
 19. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10570-5.
 20. Garner JA, Cover TL. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun* 1996; **64**: 4197-203.
 21. Padilla PI, Wada A, Yahiro K *et al.* Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTPbeta and induction of *Helicobacter pylori* VacA sensitivity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15200-6.
 22. Sommi P, Ricci V, Fiocca R *et al.* Persistence of *Helicobacter pylori* VacA toxin and vacuolating potential in cultured gastric epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; **275**: G681-8.
 23. Ricci V, Sommi P, Fiocca R *et al.* *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J Pathol* 1997; **183**: 453-9.
 24. Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 2002; **70**: 1984-90.
 25. Mirshahi F, Fowler G, Patel A *et al.* Omeprazole may exert both a bacteriostatic and a bacteriocidal effect on the growth of *Helicobacter pylori* (NCTC 11637) in vitro by inhibiting bacterial urease activity. *J Clin Pathol* 1998; **51**: 220-4.
 26. Kuhler TC, Fryklund J, Bergman NA *et al.* Structure-activity relationship of omeprazole and analogues as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J Med Chem* 1995; **38**: 4906-16.
 27. Latifi-Navid S, Siavoshi F, Mokhtari-Azad T *et al.* Neutralization of *Helicobacter pylori* cytotoxicity on Vero cells by omeprazole micronized. *Gut* 2002; **51** (Suppl. 11): p. A 16.

Neutralization of *Helicobacter Pylori* Cytotoxicity on Vero Cells by Omeprazole

Latifi Navid S

Department of Microbiology,
Faculty of Medical Sciences,
Ardabil Azad University

Siavoshi F

Department of Microbiology,
Faculty of Science, Tehran
University

Mokhtari Azad T

Faculty of Public Health,
Tehran University of Medical
Sciences

Malekzadeh R

Digestive Disease Research
Center, Tehran University of
Medical Sciences

Sohrabi MR

Digestive Disease Research
Center, Tehran University of
Medical Sciences

Massarrat S

Digestive Disease Research
Center, Tehran University of
Medical Sciences

Corresponding Author:

Saeed Latifi Navid MS,
Department of Microbiology,
Faculty of Medical Sciences,
Ardabil Azad University Ardabil,
Iran.

Tel: +98 21 61112460

Fax: +98 451 3331099

E-mail:

slatifi@khayam.ut.ac.ir

ABSTRACT

Introduction and Aims: Omeprazole is a gastric parietal cells proton pump inhibitor that is also active against *H. pylori* in vitro. This study was designed to examine the neutralization of *H. pylori* cytotoxicity on Vero cells by omeprazole micronized in strains isolated from gastritis, ulcer, cancer and Barrett's ulcer, to determine whether omeprazole can inhibit vacuolation of the Vero cells induced by cytotoxin of *H. pylori* or by urease. The effect of omeprazole on motility of *H. pylori* was assessed using concentrations lower than MIC.

Materials and Methods: The antimicrobial activity of omeprazole micronized was studied by determining the MICs for 15 *H. pylori* strains. Water extract of the bacteria (concentrated culture supernatant) and different concentrations of omeprazole were added to Vero cells in culture. Also extracted urease from *H. pylori* strains with urea (10 mM) and omeprazole were added to Vero cells in culture. The inhibitory effect of omeprazole on motility of *H. pylori* was tested in semi-solid medium.

Results: MIC of omeprazole micronized was 20 µg/ml. Omeprazole could inhibit induced vacuolation by the water extract of *H. pylori* strains in Vero cells. It could also inhibit vacuolation induced by urease. Inhibition of vacuolation strains was assessed microscopically and by the neutral red method. It was also found that omeprazole inhibits the motility of *H. pylori* strains at concentrations lower than MIC.

Conclusions: The results of this study suggest that omeprazole micronized could neutralize the vacuolation effect of *H. pylori* cytotoxin on Vero cells probably by targeting v-type ATPase. The bacterial motility was also inhibited by low concentrations of omeprazole. The results of this study considers omeprazole micronized as an effective drug which targets important virulence factors of *H. pylori* including vacuolating cytotoxin, urease, and motility. *Govaresh* 2004; 9: 161-8

Keywords: *Helicobacter pylori*, Omeprazole, Inhibition, VacA, Urease, Motility