گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۸-۱۶۱

خنثی‌سازی سیتوتوکسیسیتی هلیکوباکتر پیلوری در سلولهای vero توسط امپرازول

سعید لطیفی نوید[1*]، دکتر فریده سیاوشی[2]، دکتر طلعت مختاری آزاد[3]، دکتر رضا ملک‌زاده[4]، دکتر مسعود رضا سهرابی[5]، دکتر صادق مسرت[4]

[1] پژوهشگر، بخش میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل

[2] استادیار، بخش میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

[3] دانشیار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[4] استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[5] پژوهشگر، 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)، اوره‌آز و حرکت باکتری بررسی گردید.

مواد و روشها

MIC امپرازول در مورد پانزده سویه هلیکوباکترپیلوری تعیین گردید. سوپرناتانت کشت باکتریایی تغلیظ شد و همراه با غلظتهای مختلف امپرازول به سلولهای vero تلقیح گردید. مایع رویی حاصل از سانتریفوژ سوسپانسیون باکتریها در بافر فسفات نمکی، همراه با اوره و امپرازول به سلولهای vero تلقیح شد. مهار ایجاد واکوئول با روش جذب قرمز خنثی اندازه‌گیری 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 میلی‌لیتر تعیین گردید. تولید واکوئول در سلولهای vero، توسط سوپرناتانت کشت باکتریایی تغلیظ شده، در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر امپرازول به شدت مهار شد. امپرازول در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، از تولید واکوئول در اثر فعالیت اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری ممانعت کرد. همچنین امپرازول در غلظتهای کمتر از MIC، باعث اختلال در حرکت سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری گردید.

نتیجه‌گیری

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

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، امپرازول، مهار، vacA، اوره‌آز، حرکت

مقدمه

برای ریشه‌کن کردن هلیکوباکتر پیلوری از رژیمهای درمانی مختلف استفاده می‌شود که در اکثر آنها یک مهارکننده پمپ پروتونی (Proton Pump Inhibitor, PPI) مانند امپرازول و یا لانزوپرازول وجود دارد[1و2]. امپرازول، یک بنزوایمیدازول جایگزین 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 می‌کند. P-ATPase که در غشای سلولی هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، شبیه پمپ پروتونی سلولهای اپیتلیال معده است و در باکتریها به‌طور معمول وجود ندارد[3]. 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 می‌کند[4و5]. به نظر

*نویسنده مسئول: سعید لطیفی نوید- اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل، دانشکده علوم پزشکی، بخش میکروب‌شناسی
تلفن: ۶۱۱۱۲۴۶۰ نمابر: ۳۳۳۱۰۹۹ ۰۴۵۱
E-mail: slatifi@khayam.ut.ac.ir

می‌رسد که VacA باعث فعال شدن V-ATPase (vacuolar-type) در سلولهای اپیتلیال و افزایش میزان واکوئول و در نتیجه مرگ سلولها می‌شود[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.

اوره‌آز یک عامل بیماریزایی مهم هلیکوباکتر پیلوری است که در استقرار باکتری در مخاط معده و ایجاد زخم نقش دارد. اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری نقش مهمی در چسبیدن باکتری به سلولهای اپیتلیال و تحریک مرگ برنامه‌ریزی شده دارد[۷،۸]. اوره‌آز هیدرولیز اوره به آمونیاک و کربامات را کاتالیز می‌کند. آمونیاک حاصل موجب تشکیل واکوئول در سلولهای اپیتلیال معده می‌شود[۹]. همچنین آمونیاک تولید شده به‌واسطه ترکیب با کلر و تشکیل مونوکلرآمین، مرگ سلولی را در سلولهای اپیتلیال القا می‌کند[۱۰]. بنابراین مهار فعالیت اوره‌آز در جلوگیری از بیماریزایی این باکتری مهم است.

در بسیاری از باکتریهای بیماریزا، حرکت وابسته به تاژک و کموتاکسی، عواملی حیاتی برای استقرار در میزبان و ایجاد عفونت پایدار می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند 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 می‌شود.

در این تحقیق، میزان توانایی سویه‌های 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 اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری بررسی شد.

مواد و روشها

سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه مقطعی، پانزده سویه هلیکوباکتر پیلوری برای بررسی اثر مهارکنندگی امپرازول استفاده شدند. این سویه‌ها از نمونه‌های بیوپسی معده و مری بیماران مراجعه‌کننده 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. نمونه‌های بیوپسی در داخل محیط ترانسپورت به آزمایشگاه منتقل و روی محیط بروسلا آگار حاوی ۵٪ خون دفیبرینه، وانکومایسین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، پلی‌میکسین B ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، تری‌متوپریم ۵ میلی‌گرم در لیتر و آمفوتریسین B ۲ میلی‌گرم در لیتر، کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هوازی (۵٪ Co_2)، و دمای ۳۷°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. هویت باکتریها با رنگ‌آمیزی گرم، و مثبت بودن آزمونهای اکسیداز، کاتالاز، و اوره‌آز تأیید شد.

تعیین MIC امپرازول

حساسیت سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نسبت به امپرازول (UQUIFA, Spain) با روش agar dilution[۱۲]، 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 میلی‌لیتر، ریخته شد. از کشت تازه باکتریها، سوسپانسیونی در بروسلابرات (Oxoid, USA)، با کدورت ۳×۱۰^{۸} باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. پنجاه میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری روی بروسلا آگار حاوی امپرازول ریخته شد. و پلیت‌ها در شرایط ذکر شده گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۵ روز، کمترین غلظت امپرازول که رشد باکتریها را مهار می‌کرد به‌عنوان MIC (Minimal Inhibitory Concentration) امپرازول تعیین شد.

استخراج و تغلیظ VacA

سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در محیط بروسلابرات، حاوی ۵٪ سرم جنین گاو (Sigma, USA)، در ۳۷°C، ۵٪ CO_2 با حرکت دورانی (۱۰۰ دور در دقیقه) کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت سوسپانسیون‌های باکتریایی به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند و سوپرناتانت (مایع رویی) آنها در °C ۲۰- 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 توکسین‌های تغلیظ شده، با استفاده از محیط کشت سلول (Modified Eagle's Minimal Essential Medium, MEM, Sigma, USA) رقتهای $\frac{۱}{۵}$، $\frac{۱}{۱۰}$، $\frac{۱}{۲۰}$، $\frac{۱}{۴۰}$، $\frac{۱}{۸۰}$، $\frac{۱}{۱۶۰}$، $\frac{۱}{۳۲۰}$، $\frac{۱}{۶۴۰}$ و $\frac{۱}{۱۲۸۰}$ تهیه شد و برای بررسی بعدی مورد استفاده قرار گرفت[۱۳].

کشت سلولهای vero

برای کشت سلولهای vero (Pasteur Institute, France) از محیط MEM واجد ۱۰٪ سرم جنین گاو استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°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 ۳×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک توزیع شد. سپس برای تشکیل تک لایه سلولی، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند.

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 رقتهای 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]. به‌طور 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 شست‌وشو داده شدند. قرمز خنثی جذب شده در داخل سلولها با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید-الکل (۷۰ میلی‌لیتر اتانول، ۲۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال) خارج شد و تراکم رنگ با استفاده از الایزاریدر[1] 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، به‌عنوان تیتر ایجاد کننده واکوئول تعیین شد. آزمایش در مورد هر یک از رقتهای توکسین تغلیظ شده از سویه‌های مختلف، سه بار تکرار شد. میانگین جذب نوری چاهکهای محتوی سلولهای گرمخانه‌گذاری شده با محیط به‌تنهایی (۰/۰۰۹±۰/۱۴۰)، از میانگین جذب نوری هر یک از چاهکهای گرمخانه‌گذاری شده با سیتوتوکسین تفریق شد و نتایج به‌صورت میانگین جذب نوری خالص بیان گردید. سپس منحنی مربوط به آن رسم شد. بررسیهای میکروسکوپی نیز با استفاده از میکروسکوپ نوری (۴۰۰×) انجام شد.

خنثی‌سازی سیتوتوکسیسیتی (ایجاد واکوئول) سویه‌های مختلف هلیکوباکتر پیلوری روی سلولهای vero توسط امپرازول

به‌منظور ایجاد واکوئول در اکثر سلولهای کشت شده، عصاره‌های باکتریایی به میزان دو برابر تیتر ایجادکننده واکوئول به چاهکهای میکروپلیت‌ها اضافه شدند. امپرازول در غلظتهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه محیط کشت نگهدارنده (MEM 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 به‌صورت میانگین تراکم نوری محاسبه گردید. سلولهای تلقیح شده با عصاره‌های باکتریایی به‌تنهایی، غلظتهای مختلف امپرازول به‌تنهایی و سلولهای تلقیح نشده حاوی محیط کشت نگهدارنده، به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره آبی حاوی آنزیم اوره‌آز

از کشت تازه باکتریها سوسپانسیونی در ۲ میلی‌لیتر 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) به‌شدت 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 $3/8\times10^{-2}$ µmol urea/min/OD)، ۱۰ میلی‌مولار اوره و غلظتهای مختلف امپرازول (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) 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 به‌تنهایی، امپرازول به‌تنهایی، اوره به‌تنهایی و سلولهای تلقیح نشده حاوی محیط کشت نگهدارنده، به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند[۱۶].

اثر مهارکنندگی امپرازول روی حرکت باکتری

مهار حرکت در محیط نیمه‌جامد حاوی بروسلابرات، ۰/۳۵ درصد آگار، ۱٪ مکمل ایزوویتال- x و ۱۰٪ سرم غیر فعال شده‌جنین گاو و غلظتهای زیر MIC امپرازول ($\frac{1}{2}$، $\frac{1}{4}$، $\frac{1}{8}$ و $\frac{1}{16}$) بررسی گردید. یک لوپ از کشتهای ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی، به اندازه دو

1- ELISA reader

میلی‌متر در داخل آگار فرو برده شد و رگه‌ای به طول چهار سانتی‌متر ایجاد شد. پلیت‌ها در حالتی که در آنها رو به بالا بود، در شرایط کم هوازی و ۳۷°C، به مدت پنج روز، گرمخانه‌گذاری شدند و حرکت باکتریها به‌صورت انتشار دو طرفه از ناحیه تلقیح، بررسی گردید. برای کنترل، آگار نیمه‌جامد بدون امپرازول تلقیح شد. آزمایش درمورد هر یک از نمونه‌ها دو بار تکرار شد[۱۶].

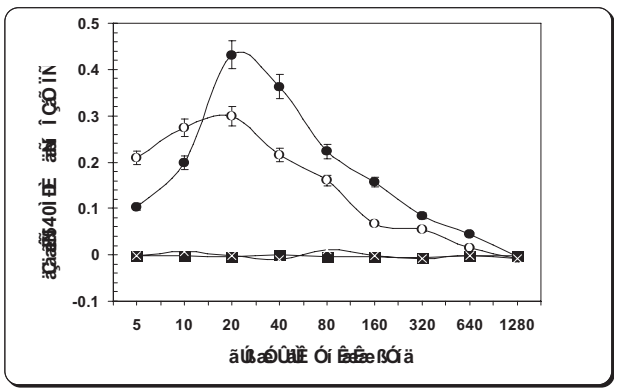
روشهای آماری

نتایج به‌صورت 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 سویه‌های مورد آزمایش ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

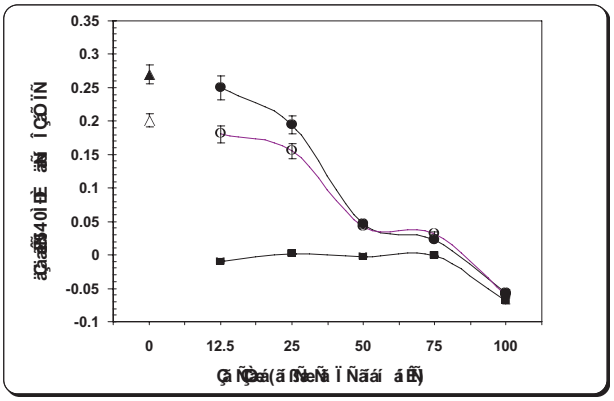
سلولهای گرمخانه‌گذاری شده با رقتهای کمتر از $\frac{1}{1280}$ سوپرناتانت کشت تغلیظ شدهٔ تمام سویه‌های جدا شده از گاستریت، زخم و سرطان به‌طور معنی‌داری جذب بالای قرمز خنثی را نسبت به گروه شاهد داشتند ($p<0/05$ در تمام موارد)، از این‌رو تمام سویه‌ها سیتوتوکسین مثبت بودند. در تمام نمونه‌ها، رقتهای کمتر از $\frac{1}{20}$ سیتوتوکسین باعث پارگی و انهدام اکثر سلولها شده بود و میزان جذب قرمز خنثی به‌طور معنی‌داری پایین بود. رقت $\frac{1}{20}$ سیتوتوکسین سویه‌های مختلف هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان رقت ایجادکننده واکوئول (بالاترین رقت عصاره باکتریایی که باعث تشکیل واکوئول در ۵۰٪ یا بیشتر سلولها، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شود) تعیین گردید. با آنکه رقت $\frac{1}{20}$ در مورد سیتوتوکسین تمام سویه‌های جدا شده از بیماران به دست آمد، اما میزان جذب قرمز خنثی و شدت تشکیل واکوئول در این رقت و رقتهای دیگر بین سویه‌های مختلف تفاوت فاحشی داشت. سیتوتوکسین سویه‌های 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 شدهٔ سویه‌های جدا شده از موارد گاستریت نشان داد ($p<0/05$ در تمام رقتهای کمتر از $\frac{1}{1280}$)، به‌طوری که میانگین جذب خالص قرمز خنثی در رقتهای مختلف توکسین ($\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{20}$ ، $\frac{1}{40}$ ، $\frac{1}{80}$ ، $\frac{1}{160}$ ، $\frac{1}{320}$ ، $\frac{1}{640}$ و $\frac{1}{1280}$) 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 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 دوگروه 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 شدهٔ هلیکوباکتر پیلوری غیرسیتوتوکسیک جدا شده از نمونه گاستریت (■)؛ همچنین سلولهای تلقیح شده با محیط کشت باکتریایی تغلیظ شده به‌تنهایی (☒)، به‌عنوان 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 می‌شود و اثرات مخرب سیتوتوکسین را مهار می‌کند؛ به‌طوری که در این غلظت کاهش شدید در میانگین جذب خالص قرمز خنثی مشاهده می‌شود ($p<0/05$). 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 میلی‌لیتر، 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 میلی‌لیتر این میزان به ترتیب به ۰/۱۸۱، ۰/۱۵۵، ۰/۰۴۲، ۰/۰۳۲ و ۰/۰۵۹- کاهش یافت. امپرازول به‌تنهایی در غلظتهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر 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 را تأیید کرد (شکلهای ۳A، ۳B و ۳C).

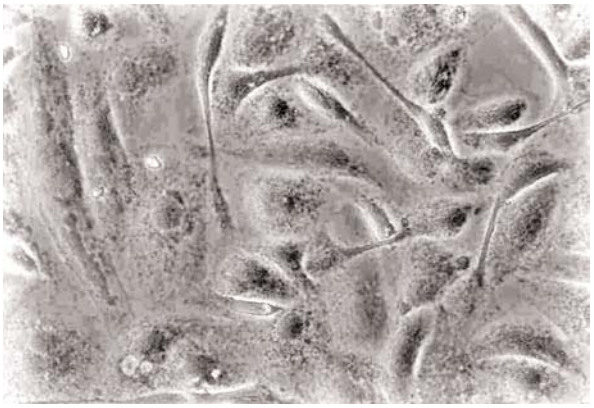


شکل ۲: اثر غلظتهای مختلف امپرازول بر جذب قرمز خنثی توسط سلولهای vero تیمار شده با سیتوتوکسین دوگروه هلیکوباکتر پیلوری (HP)

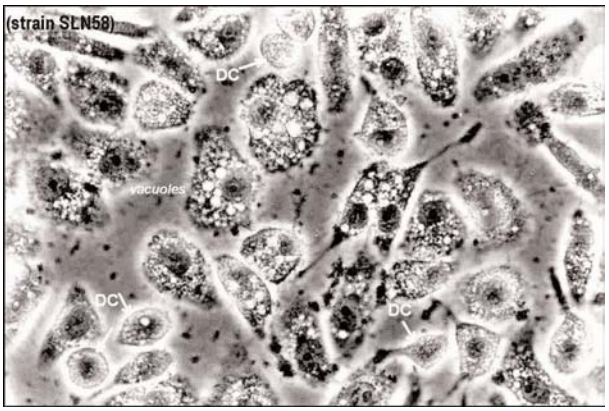
سلولهای vero به مدت ۲۴ ساعت با سیتوتوکسین HP (گروه گاستریت) به‌تنهایی (▲) و همراه با امپرازول (●)، سیتوتوکسین HP (گروه زخم و سرطان) به‌تنهایی (△) و همراه با امپرازول (○)، و همچنین امپرازول در غلظتهای مختلف به‌تنهایی (■) گرمخانه‌گذاری شده بودند.

اثر مهارکنندگی امپرازول بر تشکیل واکوئول توسط اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری، به‌صورت 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، به‌طوری که اثر مهارکنندگی در غلظت ۵۰ µg/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 ۵۴۰ نانومتر در حالتی که سلولها با سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز و اوره، گرمخانه‌گذاری شده بودند به‌طور میانگین در ۱۵ سویه هلیکوباکتر پیلوری ۰/۲۵۸ بود که پس از اضافه کردن غلظتهای مختلف امپرازول، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب به ۰/۱۶۸، ۰/۰۴۸، ۰/۰۰۹، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۵۶- کاهش یافت. امپرازول به‌تنهایی در غلظت ۱۰۰ µg/ml، باعث مهار رشد سلولهای vero شد. میانگین جذب خالص قرمز خنثی در حضور اوره به‌تنهایی و همچنین در حضور سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره‌آز به‌تنهایی به ترتیب ۰/۰۱۴- و ۰/۰۰۵- بود که نشان می‌داد اوره‌آز و اوره به‌تنهایی توانایی ایجاد واکوئول در سلولهای vero را ندارند (شکل ۴).

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



شکل ۳A: سلولهای vero کشت شده در محیط MEM (بزرگنمایی ۴۰۰)

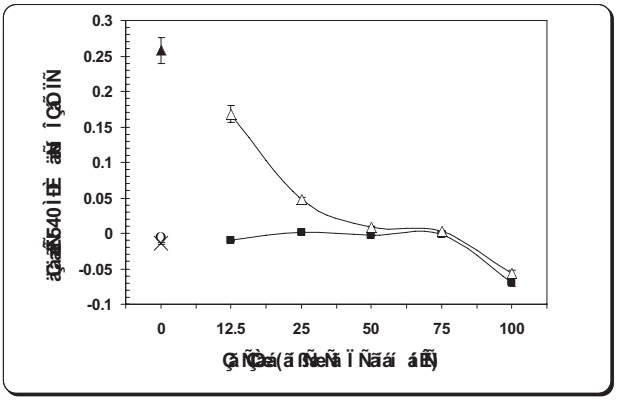


شکل ۳B: تیمار سلولهای vero، با سیتوتوکسین هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از یک بیمار مبتلا به سرطان معده

تأثیر شدید به‌صورت تشکیل واکوئول‌های زیاد، دیده‌می‌شود. سلولهای مرده و کنده شده (Dead Cell، DC) نیز با پیکان مشخص شده اند (بزرگنمایی ۴۰۰).

شکل ۳C: تیمار سلولهای vero با سیتوتوکسین هلیکوباکتر پیلوری و امپرازول (۵۰ µg/ml)

کاهش میزان واکوئول در مقایسه با شاهد (4B) کاملاً مشخص است (بزرگنمایی ۴۰۰).



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

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، به‌ویژه 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 سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری تولید می‌شود، با برخی از ATPaseهایی که جریان یون‌ها از طریق غشاهای سلولی را تنظیم می‌کنند، شباهت دارد[۱۹]. Papini و همکاران نشان دادند که VacA با ایجاد کانالهایی در غشای پلاسمایی موجب تحریک V-ATPaseکه 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 VacA 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[۱۴،۲۲،۲۳].

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 به‌طور مؤثری از تشکیل واکوئول در سلولهای vero توسط VacA و تخریب آنها ممانعت نمود. این تأثیر می‌تواند به‌دلیل 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 به‌دلیل 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 داده‌اندکه 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 به‌طور مؤثری حرکت سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری را مهار می‌کند. این تأثیر می‌تواند به‌دلیل 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 پرووِیدنسیا 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 به‌دلیل 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].

واژه‌نامه

امپرازول (Proton Pomp 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.

VacA (Vacuolating Cytotoxin A): 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 VacA، 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 s1c، s1b و s1a)، s2، m1 و m2 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.

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.

MEM (Modified Eagle's Minimal Essential Medium): 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 یا سلولهای دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

FBS (Fetal Bovine Serum): 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.

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

RPTPβ (Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase 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.

مراجع

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
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