دانشکده‌ی علوم

گروه آموزشی زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد
در رشته‌ی زیست شناسی گرایش سلولی مولکولی

عنوان:

مطالعه برهمکنش هلیکوباکترپیلوری و رده سلولی AGS در سامانه کشت توام

استاد راهنما اول:
پروفسور صابر زهری

استاد راهنما دوم:
دکتر سعید لطیفی نوید

استاد مشاور:
عزت نوری زاده

پژوهشگر:
سپیده پاسبان خسروشاهی

بهمن ۹۶

نام خانوادگی دانشجو: پاسبان خسروشاهی	**نام**: سپیده
عنوان پایان‌نامه: مطالعه برهمکنش هلیکوباکترپیلوری و رده سلولی AGS در سامانه کشت توام	
استاد راهنما اول: پروفسور صابر زهری	**استاد مشاور**: دکتر عزت نوری زاده
استاد راهنما دوم: دکتر لطیفی نوید	
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد	**رشته:** زیست شناسی
گرایش: سلولی و مولکولی	**دانشگاه: محقق اردبیلی**
دانشکده:علوم **تاریخ دفاع:** ۹۶/۱۰/۲۰	**تعداد صفحات:** ۹۷

چکیده: هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری بیماریزا است که موجب بیماری گاستریت های مختلف، از جمله گاستریت خفیف تا شدید و زخم معده می شود. در مراحل اولیه عفونت، پیوستن هلیکوباکتر پیلوری به سلولهای اپیتلیال در محل های ویژه منجر به ترشح کموکاینها و سیتوکین ها می شود. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر کشت توام هلیکو باکتر پیلوری و مشتقات آن بر قابلیت زنده مانی سلول های AGS و آپوپتوز و تکثیرآنها می باشد. با انجام PCR برای ژن های *Cag* و *Vac* مشخص شد که سویه ی هلیکوباکترپیلوری از نظر ژن *Cag* و الل های ژن *Vac*(D2,C2,i1) مثبت می باشد. و سویه ی اشریشیاکلی به عنوان کنترل استفاده شد.به منظور آماده سازی کشت توام، تراکم جمعیت باکتری توسط استانداردهای مک فارلند تنظیم شد و غلظت پروتئین توسط روش برادفورد تعیین گردید. زنده مانی و آپاپتوز سلول ها به ترتیب با تست MTT و رنگ آمیزی آکردین اورنج /اتیدیوم بروماید بررسی شد. در مقایسه با تست کنترل، هم کشی هلیکوباکتر پیلوری و استخراج پروتئین کل ، نه تنها باعث مرگ سلول ها نشد، بلکه موجب افزایش ملایم درمیزان زنده مانی سلول ها شد. بر خلاف تست های اصلی، تصاویر فلورسنت نشانگر مرگ سلولی وسیع در آزمایش های کنترلی بود. با این حال، عصاره ی LPS در آزمون های اصلی و کنترل ها منجر به کاهش میزان زنده مانی و افزایش مرگ سلولی نکروتیک در سلول ها شد.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکترپیلوری، AGS، E-coli، MTT

فهرست مطالب

شماره و عنوان مطالب **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲-بیماری های مرتبط با هلیکوباکترپیلوری ۵

۱-۲-۱- مورفولوژی باکتری ۵

۱-۲-۲- متابولیسم باکتری ۶

۱-۲-۳- مکانیسم زندگی باکتری ۶

۱-۳- ژن‌های هلیکوباکترپیلوری ۸

۱-۳-۱- ژن Vac A ۸

۱-۳-۲- ژن Cag ۹

۱-۴- لیپو پلی ساکارید (LPS) ۹

۱-۵- هلیکوباکترپیلوری و بروز سرطان ۱۰

۱-۶- مورفولوژی و خصوصیات اشریشیاکلی ۱۱

۱-۶-۱- صفات عمومی انتروباکتریاسه ۱۱

۱-۷- مورفولوژی معده انسان ۱۲

۱-۸- سرطان ۱۲

۱-۹- سرطان معده ۱۳

۱-۹-۱-انواع سرطان معده ۱۴

۱-۱۰- روش‌های مختلف درمان سرطان ۱۶

۱-۱۱- روش‌های متداول درمان سرطان ۱۶

۱-۱۲- روش‌های نوین درمان سرطان ۱۷

۱-۱۳- استفاده از محصولات طبیعی در سرطان ۱۸

۱-۱۴- چرخه سلولی ۱۹

۱-۱۴-۱- تنظیم چرخه سلولی ۲۰

۱-۱۵- دسته بندی آدینوکارسینومای معده ۲۲

۱-۱۶- میزان وقوع سرطان معده ۲۲
۱-۱۷- میزان مرگ و میر سرطان معده ۲۳
۱-۱۸- تاثیر هلیکوباکترپیلوری در القای گیرنده رشد EGFR ۲۴

فصل دوم: مواد و روش پژوهش

۲-۱- ابزار و مواد مورد استفاده در پژوهش ۲۷
۲-۲- تهیه مواد و محلول‌های مورد استفاده ۲۸
۲-۲-۱-۱- محیط کشت هلیکوباکترپیلوری ۲۸
۲-۲-۱-۲- محیط انتقال (ترنسپورت) کوتاه مدت..... ۲۸
۲-۲-۱-۳- محیط انتقال (ترانسپورت) بلند مدت ۲۸
۲-۲-۱-۴- محیط ذخیره ۲۹
۲-۳- تهیه‌ی آنتی بیوتیک..... ۲۹
۲-۴- جداسازی و شناسایی هلیکوباکترپیلوری..... ۲۹
۲-۵- محیط کشت اشریشیاکلی ۲۹
۲-۵-۱- محیط کشت SOB جامد..... ۳۰
۲-۵-۲- محیط کشت LB ۳۰
۲-۶- کشت باکتری اشریشیاکلی ۳۰
۲-۷- رنگ آمیزی باکتری با کیت گرم ۳۰
۲-۸- استخراج DNA باکتری به روش دستی ۳۱
۲-۹- استخراج LPS از باکتری به صورت جامد ۳۲
۲-۱۰- استخراج پروتئین از باکتری ۳۲
۲-۱۱- تکثیر توسط واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز (PCR) ۳۳
۲-۱۲- انواع PCR های بکار برده شده ۳۶
۲-۱۲-۱- PCR معمولی ۳۶
۲-۱۲-۲- Multiplex PCR ۳۶
۲-۱۳- الکتروفورز ژل آگاروز ۳۷
۲-۱۴- الکتروفورز SDS page ۳۹
۲-۱۴-۱- آماده سازی نمونه..... ۴۰

۲-۱۴-۲- روش آزمایش الکتروفورز ۴۰
۲-۱۵- مواد رنگ آمیزی ۴۱
۲-۱۶- تریپان بلو ۴۱
۲-۱۷- تهیه محلول MTT ۴۲
۲-۱۸- روش‌های سلولی ۴۲
۲-۱۸-۱- تهیه سلول ۴۲
۲-۱۸-۲- تهیه محیط کشت ۴۲
۲-۱۸-۳- تعویض محیط کشت ۴۲
۲-۱۸-۴- پاساژ دادن کشت ۴۳
۲-۱۸-۵- منجمد کردن سلول‌های سرطانی و ذخیره آن ۴۴
۲-۱۸-۶- روش ذوب کردن سلول‌ها ۴۴
۲-۱۹- کشت توام سلول سرطانی با باکتری اشریشیاکلی و هلیکوباکترپیلوری ۴۵
۲-۲۰- اندازه گیری مقدار پروتیئن ۴۵
۲-۲۰-۱- تهیه محلول برادفورد(Bradford solution) ۴۵
۲-۲۰-۲- معرف پروتئین(Protein reagent) ۴۶
۲-۲۰-۳- روش استاندارد برادفورد ۴۶
۲-۲۱- شمارش سلول‌ها با تریپان بلو ۴۶
۲-۲۲- آزمون MTT و سنجش حیات سلول‌ها ۴۷
۲-۲۳- تست MTT در پلیت ۲۴ خانه وحذف متعاقب باکتری ۴۷
۲-۲۴- تهیه اتیدیوم بروماید و آکردین اورنج ۴۸
۲-۲۵- بررسی اثر آپوپتوزی هلیوباکتر پیلوری و اشریشیا کلی با استفاده از آزمون آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید (AO/EB) ۴۸

فصل سوم: نتایج و یافته‌های پژوهش

۳-۱- بررسی تاثیر هلیکوباکتر پیلوری و اشریشیاکلی(به عنوان شاهد باکتری) بر روی رده‌ی سلولی AGS ۵۰

۳-۲- بررسی وضعیت سلول های AGS بعد از تیمار با باکتری HP واشریشیاکلی و تریپسینه کردن و حذف باکتری ۵۲

۳-۳- بررسی تاثیر پروتئین های استخراج شده از هلیکوباکترپیلوری و باکتری‌اشریشیاکلی (به عنوان شاهد باکتری) بر روی رده‌ی سلولی AGS..... ۵۴

۳-۴- بررسی تاثیر LPS استخراج شده از هلیکوباکترپیلوری و باکتری اشریشیاکلی (به عنوان شاهد باکتری) بر روی رده‌ی سلولی AGS ۵۶

۳-۵- بررسی وضعیت پروتئین های استخراج شده توسط الکتروفورز در سطح SDS PAGE ۵۸

۳-۶- بررسی آل‌های مختلف ژن VacA هلیکوباکترپیلوری و وضعیت CagA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)..... ۵۹

۳-۷- نتایج حاصل از آزمون AO/EB با تاثیر باکتری HP و اشریشیاکلی بر روی رده‌ی سلولی AGS ۶۰

۳-۸-نتایج حاصل از آزمون AO/EB با تاثیر پروتئین‌استخراج شده از اشریشیاکلی و HP بر روی رده‌ی سلولی. ۶۱

۳-۹- نتایج حاصل از آزمون AO/EB با تاثیر LPS استخراج شده از اشریشیاکلی و HP بر رده‌ی سلولی AGS۶۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- بحث ۶۵

۴-۲- نتیجه‌گیری کلی ۷۲

۴-۳-پیشنهادات ۷۳

فهرست منابع ۷۴

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول **صفحه**

جدول ۲-۱- ابزار و دستگاه‌های مورد استفاده..... ۲۷
جدول ۲-۲- لیست مواد مصرفی در تحقیق..... ۲۷
جدول ۲-۳ – پرایمرهای استفاده شده برای PCR..... ۳۴
جدول ۲-۴- مواد استفاده شده برای PCR master mix..... ۳۵
جدول ۲-۵- مواد استفاده شده واکنش PCR برای هر ویال ۳۵
جدول ۲-۶- دامنه‌ی جداسازی مولکول‌های خطی بر اساس درصد آگاروز در ژل..... ۳۸
جدول۳-۱- تجزیه واریانس اثر تیمار هم کشتی باکتری *HP* و اشریشیاکلی بر روی رده سلولی AGS در مدت زمان ۱۶ ساعت
..... ۵۱
جدول ۳-۲-تجزیه واریانس زنده مانی سلول های AGS بعد از تیمار با باکتری *HP* و اشیرسیاکلی حذف باکتری در مدت زمان ۱۶ ساعت
..... ۵۳
جدول ۳-۳-تجزیه واریانس اثر تیمار پروتئین استخراج شده از باکتری *HP* و اشریشیاکلی بر روی رده سلولی AGS در مدت زمان ۱۶ ساعت
..... ۵۵
جدول۳-۴-تجزیه واریانس اثر LPS استخراج شده از باکتری *HP* واشریشیاکلی بر روی رده سلولی AGS در مدت زمان ۱۶ ساعت
..... ۵۷

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل **صفحه**

شکل ۱-۱- برخی ازعلایم ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری.....۱۱
شکل۱-۲- مراحل ایجاد سرطان ۱۴
شکل۱-۳- مراحل چرخه سلولی ۱۹
شکل۱-۴- فعال سازی گیرنده رشد EGFR توسط هلیکوباکترپیلوری و پیامدهای سلولی آن ۲۵
شکل۲-۱- قراگیری اتیدیوم بروماید درون رشته‌ی DNA.....۳۹
شکل ۳-۱بررسی وضعیت اثر کشت توام باکتری *HP* و*E-coli* بر روی رده سلولی AGS در بازه زمانی ۱۶ ساعت.....۵۲
شکل ۳-۲- نمودار ستونی میانگین مقایسه اثر کشت توام باکتری های *HP* و *Ecoli* بر رده سلولی AGS در بازه زمانی ۱۶ ساعت ۵۲
شکل ۳-۳- بررسی وضعیت اثربررسی وضعیت سلول های AGS بعد از تیمار با باکتری *HP* واشریشیاکلی و تریپسینه کردن و حذف باکتری.....۵۴
شکل ۳-۴- نمودار ستونی میانگین اثر اثر بررسی وضعیت سلول های AGS بعد از تیمار با باکتری *HP* واشریشیاکلی و تریپسینه کردن و حذف باکتری ۵۴
شکل ۳-۵- بررسی وضعیت اثرپروتئین های استخراج شده از باکتری های *HP* و *E-coli* بر روی رده سلولی AGS در بازه زمانی ۱۶ ساعت.....۵۶
شکل ۳-۶- نمودار ستونی میانگین مقایسه اثر پروتئین استخراج شده باکتری های *HP* و *E-coli* بر رده سلولی AGS در بازه زمانی ۱۶ ساعت.....۵۶
شکل ۳-۷- بررسی وضعیت اثر لیپید استخراج شده از باکتری های *HP* و*E-coli* بر روی رده سلولی AGS در بازه زمانی ۱۶ ساعت ۵۸
شکل ۳-۸- نمودار ستونی میانگین مقایسه اثر لیپید استخراج شده ازباکتری های *HP* و*E-coli* بر رده سلولی AGS در بازه زمانی ۱۶ ساعت.....۵۸
شکل ۳-۹- بررسی وضعیت پروتئین های استخراج شده توسط الکتروفورز در سطح SDS PAGE ۵۹
شکل ۳-۱۰- سویه‌ی هلیکوباکترپیلوری مورد استفاده در تحقیق.....۵۹
شکل ۳-۱۱- تصاویر شاهد سلولی در رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیدوم بروماید ۶۱
شکل ۳-۱۲-رنگ آمیزی سلول‌های AGS تیمار شده با باکتری *HP* توسط آکریدین اورنج / اتیدیدوم بروماید.....۶۱
شکل ۳-۱۳- رنگ آمیزی سلول‌های AGS تیمار شده با باکتری *Ecoli* توسط آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید.....۶۱
شکل ۳-۱۴- تصاویر شاهد سلولی در رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیدوم بروماید ۶۲
شکل ۳-۱۵- رنگ آمیزی سلول‌های AGS تیمار شده با پروتئین *HP* توسط اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید ۶۲
شکل ۳-۱۶- رنگ آمیزی سلول‌های AGS تیمار شده با پروتئین باکتری *Ecoli* توسط آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید ۶۲
شکل ۳-۱۷- تصاویر شاهد سلولی در رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیدوم بروماید ۶۳
شکل ۳-۱۸- رنگ آمیزی سلول های AGS تیمار شده با LPS باکتری *HP* توسط آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید....۶۳
شکل ۳-۱۹- رنگ آمیزی سلول‌های AGS تیمار شده با LPS باکتری *Ecoli* توسط آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید.۶۳

Abbreviations:

Abbreviations	Definition
AGS	Adenocarcinoma Gastric cell line
AO/EB	Acridine orange/Ethidium bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Ecoli	*Escherichia coli*
EGFR	Epidermal growth factor receptor
HP	*Helicobacter pylori*
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffer saline

فصل اول:

مقدمه وکلیات پژوهش

۱-۱-مقدمه

گزارش‌ها در مورد وجود باکتری‌های مارپیچی در معده انسان و پستانداران به قرن دوزدهم برمی‌گردد. در سال ۱۹۸۲ مارشال موفق به کشت باسیل‌های کوچک و خمیده شکل شد بدین ترتیب شناسایی و بررسی باکتری امکان پذیر گردید (Mammano, Belluco et al. 2006). هلیکو باکترپیلوری گونه‌ی غالب میکروبیوم معده‌ی انسان است و کلونیزه شدن آن باعث پاسخ التهابی و مدام می‌شود. ورم معده ناشی از هلیکوباکتر قوی‌ترین عامل خطر برای سرطان معده محسوب می‌شود ؛ با این حال تنها بخش کوچکی از افراد دچار حالت بد خیمی می‌شوند. هدف پزشکان و محققان زیست شناسی یافتن روش‌هایی برای پیشگیری از آلودگی هلیکوباکتر در جوامع انسانی می‌باشد (Polk and Peek 2010).

سرطان معده دومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. هر ساله حدود ۷۰۰۰۰۰ نفر تسلیم این سرطان می‌شوند. و نرخ های بقاء ۵ ساله در ایالات متحده کمتر از ۱۵ درصد است. دو گونه‌ی متمایز از لحاظ بافت شناسی سرطان معده، هر یک با ویژگی‌های مختلف پاتوفیزیولوژیک شرح داده شده اند.سرطان معده نوع منتشر معمولا بر افراد جوان تاثیر می‌گذارد و شامل سلول‌های نئوپلاستیک[1] نفوذ کننده بصورت انفرادی است که ساختارهای غده فرم را تشکیل نمی‌دهند. شایع ترین شکل سرطان معده، سرطان نوع روده‌ای، از طریق یک سری ازمراحل بافت شناسی که توسط انتقال از مخاط نرمال تا گاستریت[2] مزمن سطحی آغاز می‌شود، که پس از آن به گاستریت آتروفیک و متاپلازی روده‌ای و در نهایت به دیسپلازی[3] و سرطان منجر می‌شود . هلیکوباکترپیلوری یک گونه‌ی میکروبی است که به طور خاص در اپیتلیوم معده مستقر می‌شود و آن شایع‌ترین عفونت باکتریایی در سراسر جهان است. هر فردی که به این ارگانیسم آلوده است دچار ورم معده می‌باشد که به طور معمول برای چند دهه ادامه دارد (Polk and Peek 2010).

عفونت هلیکوباکتر پیلوری قوی‌ترین عامل خطر شناخته شده برای سرطان‌هایی است که در معده به وجود می‌آیند، و مطالعات نشان می‌دهد که خطر ابتلا به سرطان معده توسط هلیکوباکترپیلوری حدود

[1]-Neoplastic
[2]-Gastritte
[3] -Displaza

۷۵ درصد است. اگر چه هلیکوباکترپیلوری به طور قابل توجهی خطر ابتلا به دو نوع منتشره و روده‌ای را افزایش می‌دهد اما التهاب مزمن برای توسعه‌ی سرطان‌های نوع منتشرمورد نیاز نیست و نشان می‌دهد که مکانسیم‌های تاثیر هلیکوباکتر پیلوری برای القاء انواع سرطان‌ها متفاوت است. ریشه‌کنی هلیکوباکتر به طور قابل توجهی خطر ابتلا به سرطان را در افراد آلوده کاهش می‌دهد، و این عقیده را تقویت می‌کند که این ارگانسیم مراحل اولیه‌ی بروز سرطان معده را تحت تاثیر قرار می‌دهد.با این حال، تنها بخش کوچکی از افراد آلوده تاکنون نئوپلازی را توسعه و خطر ابتلا به سرطان را نشان داده‌اند. بررسی مکانسیم‌های بیولوژیکی هلیکوباکترپیلوری از اهمیت بالایی برخوردار است (Polk and Peek 2010). به هرحال بیماری‌های مربوط به مجرای روده‌ای فوقانی اغلب قبل از کشف هلیکوباکتر پیلوری غیر قابل درمان بود. اثبات علمی خاستگاه عفونی بیماری‌های معده تا قبل از سال ۱۹۸۲ فراهم نبود تا اینکه در این سال‌ها ، روبین‌وارن[۴] و باری‌مارشال[۵] هلیکوباکترپیلوری را از نمونه‌های بیوپسی معده جدا کرده و ارتباط بین عفونت و التهاب موکوسی را به اثبات رسانند. به دنبال آن این دانشمندان تحقیقات گسترده‌ای را با آزمایش بر روی خود انجام دادند که منجربه التهاب معده (عفونت معده) توسط هلیکوباکترپیلوری شد. به خاطر اینکه اکثر افراد در خلال زندگی خود با بیماری‌های مرتبط با هلیکوباکترپیلوری مواجه هستند، بنابراین کشف هلیکوباکترپیلوری منجر به تحول بزرگی در تشخیص و درمان بیماری‌های گوارشی گردید. این دو دانشمند موفق به دریافت جایزه‌ی نوبل در پزشکی در سال ۲۰۰۵ شدند (Marshall and Warren 1984).

[4]-Robinworn
[5] -Paremarchal

۱-۲- بیماری‌های مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری

مطالعات متعدی نشان داده که هلیکوباکترپیلوری نقش اساسی درایجاد التهاب معده ، زخم معده و دوازدهه داشته و یکی از عوامل دخیل در سرطان معده می‌باشد . تغییرات آبشاری مخاط معده از التهاب حاد به التهاب آتروفیک[۶] همراه با متاپلازی[۷] روده‌ای، درنهایت به دیسپلازی و سرطان معده منجر می‌شود. هلیکوباکترپیلوری یکی از عوامل اصلی التهاب معده که با افزایش بیان برخی فاکتورهای رشد مانندگاسترین و Cox2 و پروتئین‌های ضد آپاپتوزی شامل survivin و bcl-2 همراه می‌شود.بیان بالای این پروتئین‌ها منجر به افزایش تکثیر سلول‌های آتروفیک جهش یافته، ازیاد آنژیوژنز، مهار آپاپتوز و در نهایت منجر به تشکیل تومورهای معده می‌شود. مطالعات نشان داده که ریشه‌کنی باکتری به شدت موجب کاهش شیوع سرطان معده می‌شود. از این رو هلیکوباکترپیلوری یکی از عوامل اصلی در ایجاد سرطان معده بوده و ریشه‌کنی آن در افرادی که درمعرض خطر بالا هستند شیوع سرطان معده را کاهش می دهد (Konturek, Konturek et al. 2006).

یکی از ویژگی‌های مهم هلیکوباکترپیلوری، تولید مقدار فراوان آنزیم اوره آز است. مشخص شده است که اوره آز یک عامل ویرولانس مهم در باکتری است که می‌تواند در کلونیزه[۸] شدن باکتری در موکوس معده و صدمه و ایجاد ضخم معده، نقش داشته باشد. اوره آز باکتری توانایی تولید آمونیاک را دارد که باعث چسبندگی بیشتر باکتری به سلول‌های مخاطی معده می‌شود (Konturek, Konturek et al. 2006).

۱-۲-۱-مورفولوژی باکتری:

برخی از ویژگی‌های باکتری عبارت است از :

- باسیلی و گرم منفی
- دیواره‌ی سلولی صاف
- نداشتن برآمدگی انتهایی

[6] -Artofique
[7] -Metaphlase
[8] -colones

باکتری در معده به شکل مارپیچی و اسپیرال فرم است گرم منفی و دارای دیوارای خشن (Rough) از ویژگی‌های مهم باکتری تاژهای غلاف دار آن می‌باشد. معمولا تعداد تاژه‌ها چهار تا شش عدد می‌باشد (Konturek, Konturek et al. 2006).

۱-۲-۲-متابولیسم:

مطالعات انجام شده وجود مسیر تخمیری و احیاء فومارات را که ویژگی بی هوازی‌هاست نشان می‌دهد. باکتری دارای آنزیم‌های مسیر آنتردودورف می‌باشد که با توجه به آن پیشنهات می‌شود که ممکن است این باکتری یک میکروارگانیسم قدیمی باشد که در طول تاریخ همراه با انسان تکامل یافته است وجود مسیرهای سنتز پورین و نوکلئوتیدها، یادآور انگل‌های درون سلولی مانند متیکوباکتریوم[9] لپره است.اما هنوز مدارکی دال بر درون سلولی بودن آن یافت نشده است. باکتری دارای سیکل اوره است که از ویژگی‌های انگل‌های یوکاریوتی است . تمام این صفات نشان می‌دهد که هلیکوباکتر پیلوری یک ارگانیسم غیرعادی است که نسبت به یک زیستگاه خاص در طی تکامل سازش پیدا کرده و انواعی از فعالیت های متابولیکی را کسب کرده است که متفاوت از باکتری های بیماری‌زای معمول است این باکتری یک میکروارگانیسیم قدیمی می‌باشد که در طول تاریخ همراه با انسان تکامل یافته است (Kumar Verma et al. 2011).

۱-۲-۳-مکانسیم زندگی باکتری:

قدرت حرکت هلیکوباکتر از مهم‌ترین خاصیت این باکتری برای نفوذ به داخل موکوس معده است. تاژه‌ها و فرم منحنی شکل به این باکتری اجازه نفوذ و حرکت در موکوس معده را فراهم می‌کند. آنزیم اوره آز به باکتری توانایی تحمل شرایط اسیدی معده را می‌دهد هنگامی که باکتری در مجاورت سلول ساکن شد، شروع به سنتز اوره آز می‌نماید که احتمالا بر متابولیسم باکتری هم تاثیر دارد (Fan, Gunasena et al. 2000, Chan, Chung et al. 2001). این باسیل گرم منفی می‌تواند در لایه‌های زیرین مخاطی معده‌ی انسان کلونیزه شده (Sokolova, Bozko et al. 2008) و به علت توانایی بالا در ایجاد

[9] -Methicobacterium

تطابق با محیط برای مدت طولانی در معده زنده بماند (Ebert, Niemeyer et al. 2006 Kraft, Stack et al. 2006) . هلیکوباکتر پیلوری چندین فاکتوربیماریزایی از قبیل اوره آز، فلاژل[10]، paA، *CagA*، *Vac*A، BabA، SabA، AlpA/AlpB، IceA، DupA، LPS، OipA ، را دارد (Dubreuil, Del Giudice et al. 2002, Ebert, Niemeyer et al. 2006) که به واسطه‌ی یک سری مولکول‌های پذیرنده موجود در سطح خود، به گیرنده‌های سلول‌های اپیتلال سلول‌های معده متصل می‌شود و با سایر فاکتورها بیماری‌زایی خود را اعمال می‌کنند (Abadi, Taghvaei et al. 2013).

هلیکو باکتر پیلوری می‌تواند بیماری‌هایی از قبیل زخم دوازدهه، زخم معده، سرطان معده و لنفومای بافت لنفوئیدی همراه مخاط معده(MALT) به وجود آورد (Kumar, Kumar et al. 2008).

از میان بیماری‌های ناشی از این باکتری، سرطان از اهمیت به سزایی برخوردار است. چنانچه تک تک فاکتورهای بیماریزایی را در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم می‌توانیم به دیدگاه‌های کاربردی آنها در درمان و تولید واکسن و مکانسیم‌های دفاعی علیه این ارگانسیم دست یابیم. با این وجود از دو جنبه می‌توان این باکتری را بررسی نمود یک جنبه در ارتباط با سیر بیماریزایی این باکتری به عنوان یک عامل کارسینوژن در محیط معده و جنبه‌ی دوم دیدگاه کاربردی در زمینه پیراپزشکی و داروسازی است. بنابراین هلیکوباکترپیلوری دارای دو پتانسیل می‌باشد. از یک سو یک پاتوژن است و از سوی دیگر با به کارگیری استراتژی‌ها و تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی از این پاتوژن[11] به عنوان یک ابزار برای درمان سرطان می‌توان بهره برد.

پیچیدگی بیماری‌زایی هلیکوباکترپیلوری از آن جهت است که یک سو باکتری عواملی دارد که باعث القای آپاپتوز می‌شود و ازسوی دیگر عواملی نیز وجود دارد که باعث القای تکثیر سلولی می‌شود (Kumar, Kumar et al. 2008).

[10] -Flagen
[11] -Pathogen

۱-۳-ژن‌های هلیکوباکترپیلوری:

۱-۳-۱-ژن *VacA*:

*Vac*A به صورت یک پروتوکسین ۸۸ کلیودالتونی‌کد می‌شود. اما توکسین *Vac*A ترشح شده در حالت واسرشته، باندی حدود ۹۰ کیلو دالتون در ژل تشکیل می‌دهد (Fan, Gunasena et al. 2000). مطالعات انجام شده نشان داده که پلی پپتید ۳۳ کلیودالتونی مشتق شده از قسمت‌های انتهایی کربوکسیلی پروتوکسین[۱۲] محدود به باکتری بوده و ترشح نمی‌گردد (Rektorschek, Buhmann et al 2000). همه‌ی سویه‌های هلیکوباکترپیلوری، از نسخه از ژن توکسین[۱۳] (*Vac*A) را دارند.القای جهش در ژن *Vac*A باعث مختل شدن توانایی هلیکوباکترپیلوری برای واکوئول زایی در سلول‌های اپی تلیال می‌گردد. همچنین اثرات توکسیک مرتبط با *Vac*A نیز مهار می‌شود (Pelicic, Reyrat et al. 1999).

سویه‌های موتان[۱۴] هلیکوباکترپیلوری، که در قسمتی از ناحیه‌ی انتهایی آمینی کد کننده *Vac*A حذف شدگی دارند پروتئین‌های *Vac*A ناقص را بیان می‌کنند که قابلیت ترشح داشته، اما توانایی تشکیل اولیگومر[۱۵] وفعالیت سیتوتوکسیک مشخص ندارند (Reyrat, Lanzavecchia et al. 1999).

*Vac*A باعث ایجاد واکوئول در سلول‌اپی تلیال، در شرایط آزمایشگاه‌ی می‌شود، اما سریعا منجر به مرگ سلولی نمی‌گردد. وقتی که سلول‌های اولیه اپی‌تلیال معده انسان در معرض دوز بالایی از توکسین قرار می‌گیرند مرگ سلولی بعد از آن دوز اتفاق می‌افتد. در مقابل مرگ سلولی معمولا در پوشش‌های سلولی سرطانی در معرض توکسین قرار گرفته‌اند ایجاد نمی‌شود. اینکه آیا *Vac*A منجربه مرگ سلولی در شرایط in vivo می‌شود یا نه، هنوز ناشناخته است. اما مشخص شده که در موش *Vac*A منجر به تخریب اپی تلیوم معده می‌گردد، که ممکن است به خاطر فقدان سلولی باشد (Fan, Gunasena et al. 2000).

---

[12] -Proteinsin
[13] -Toxin
[14]-Mutan
[15] -Oligomer

۱-۳-۲-ژن *Cag* :

از ژن‌های دیگر هلیکوباکترپیلوری که بیماری‌زایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. سیستم ترشحی نوع ۴ کد شده توسط این جزیره بیماری‌زایی، پروتئین *CagA* را به داخل سلول‌های اپتلیال معده میزبان تزریق می‌کند. از این رو پروتئین به طور مستقیم و یا با تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب آسیب به سلول‌های اپیتلیال می‌شود. سویه‌های *Cag* مثبت به طور قابل توجهی خطر افزایش سرطان معده را در مقایسه با سویه‌های *Cag* منفی افزایش می‌دهد. ژن‌های درون جزیره *Cag* پروتئین‌هایی را رمز گذاری می‌کنند که یک سیستم ترشحی باکتریایی نوع IV را تشکیل می‌دهد، که پروتئین‌های میکروبی را خارج می‌سازد. محصول ژن نهایی در جزیره *CagA* درون سلول‌های اپیتلیال میزبان بعد از تصال باکتری جابه جا و فسفریله می‌شود. بیان تراریخته *CagA* در موش‌ها منجربه تکثیر سلولی و توسعه‌ی سرطان اپیتلیال معده می‌شود و *CagA* آپاپتوز را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد (Polk and Peek 2010).

از جمله فعالیت‌های سلولی که اخیرا برای *CagA* شناسایی شده می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱.آنکوپروتئین[۱۶](Zhu, Zhong et al. 2005)

۲.موتاژن (Tsutsumi, Takahashi et al. 2006)

۳.اختلال در قطبیت سلولی و اتصال سلول به سلول (Bagnoli, Buti et al. 2005)

۴.تاثیر روی مسیرهای انتقال سیگنالی سلولی (Hirata, Maeda et al. 2006)

۵. القای وضعیت دیسپلازی و آدنوکارسینومای معده شده و در بروز سرطان نقش مهمی دارد (Franco, Israel et al. 2005).

۱-۴-لیپوپلی ساکارید (LPS) ۱۷:

لیپوپلی ساکارید (LPS) یک خانواده از گلیکولیپیدهای فسفریله‌ی سمی در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی شامل هلیکوباکترپیلوری هستند LPS شامل قسمت چربی به نام لیپید A می‌باشد که دارای یک الیگوساکارید هسته‌ای و یک زنجیره پلی ساکارید که در مقایسه با LPS باکتری‌های دیگر

[16] -Ancoprotein
[17] -Lipopolysaccharides

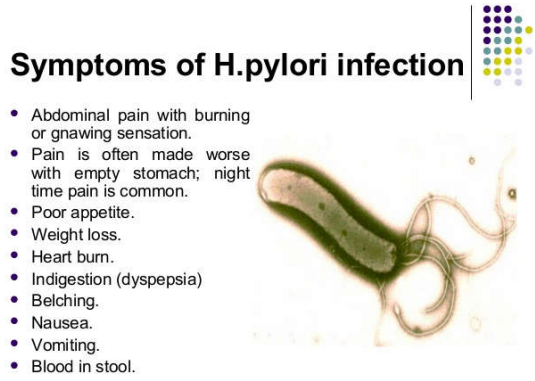
LPS هلیکوباکتر و لیپید A باعث کاهش فعالیت ایمونولوژیک در محدوده‌ی سیستم‌های آزمایشی می‌شود. اولیگوساکاریدهای LPS که بخشی از آن در ارتباط با یک پروتئین ۲۵ کیلودالتونی است باعث اتصال این باکتری به غشای لامینین می‌شود و از این رو در ارتباط با گیرنده‌ی لامینین سلول‌های معده در غشای پایه دخالت دارد. این امر برای کلونیزه شدن باکتری بسیار مهم است و در ایجاد پاسخ های التهابی نقش دارد.

۱-۵-هلیکوباکتر پیلوری و بروز سرطان:

برای ایجاد بیماری مهمترین اتفاق اولیه اتصال به گیرنده‌های سطح سلول میزبان است. میانکنش بین باکتری و سلول نه تنها موجب استقرار باکتری شده، بلکه برخی از این اتصالات هدفمند، آغازگر یکسری مسیرهای آبشاری سیگنالینگ داخل سلولی نیز می‌باشدکه سبب بروز تغییراتی در سلول شده و نتیجه آن آسیب‌زایی به سلول و بافت است. هلیوباکترپیلوری در ابتدا به کلاژن[۱۸] تیپ چهار متصل می‌شود و این اتصال باعث استقرار و تهاجم باکتری به بافت لامینا می‌گردد. پروتئین مهم دیگری که باکتری قادر به اتصال با آن می‌باشد، لامینین است (Sicinschi, Correa et al. 2010).

لامینین پروتئین اصلی غشای پایه می‌باشد. هلکوباکترپیلوری پس از آسیب رساندن به سلول در معرض غشای پایه قرار می‌گیرد و با استفاده از گیرنده‌های سطحی خود از قبیل LPS و پروتئین‌های ۲۵ و ۶۷ کلیودالتونی به لامینین متصل می‌شود.این اتصال باعث استقرار بهتر باکتری در نواحی آسیب دیده و زخم خواهد شد و به دنبال آن حالت سرطانی ممکن است بروز دهد (Jafarzadeh, Mirzaee et al 2009).

[18] -Collagen



شکل۱-۱: برخی ازعلایم ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری

۱-۶-مورفولوژی و خصوصیات اشریشیاکلی:

خانواده انتروباکتریاسه‌ها[1] بزرگترین و نا متجانس‌ترین مجموعه باسیلهای گرم منفی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند. در مجموع ۳۲ جنس و بیش از ۱۳۰ گونه از این خانواده توصیف شده که از لحاظ ساختار بیوشیمیایی و ساختار آنتی‌ژن طبقه‌بندی شده‌اند. برخی ارگانیسمها مثل سالمونلا[2] و شیگلا[3] همیشه با بیماری در ارتباط هستند. برخی به عنوان اعضای فلور طبیعی بوده و با ایجاد شرایط جدید مانندکسب ژن‌های بیماریزای موجود در پلاسمید[4] و باکتریوفاژ[5] و غیره قدرت بیماریزایی را بدست آورده سبب ایجاد عفونت‌های فرصت طلب می‌شوند(اشرشیا کلی،کلبسیلا پنومونیه،پروتئوس میرابیلیس)

۱-۶-۱-صفات عمومی انتروباکتریاسه[6]:

۱. باسیل گرم منفی

۲. اکسیداز منفی

۳. کاتالاز مثبت

---

[1] -Enterobacteriaceae
[2] -Salmonella
[3] -Shigella
[4] -Plasmid
[5] -Bakteriophagen
[6] -Enterobakterien

۴. هوازی-بی هوازی اختیاری

۵. گلوکز را به جای اکسید تخمیر می‌کنند.

۶. انواع متحرک فلاژل دارند.

جنس اشریشیاکلی فراوان‌ترین ارگانیسم بی‌هوازی اختیاری موجود در کلون و مدفوع است. شامل ۵ گونه است که اشریشیاکلی با اهمیت‌ترین گونه آن می‌باشد. این باکتری باعث اسهال خونی همراه با درد شکمی و به ندرت با تب گزارش می‌شود.بیشترین موارد بیماری در کودکان زیر ۵ سال مشاهده می‌شود .(کارگر,وهمکارن ۲۰۱۳)

۱-۷-مورفولوژی معده انسان:

دستگاه گوارش وظیفه‌ی هضم و جذب غذا و مواد مورد نیاز بدن و قابل استفاده کردن انرژی برای بدن را دارد. معده قسمتی از لوله‌ی گوارش است که ما بین روده‌ی کوچک و مری قرار دارد.در حقیقت می‌توان گفت که معده بخش متسع شده‌ی لوله گوارش است که وظیفه‌ی اصلی آن هضم غذاست دو سر معده با دو دریچه محدود شده است. مخاط معده چین خورده است که این چین خوردگی به جمع و کوچک شدن آن در هنگام خالی بودن کمک شایانی می‌کند. معده بافتی غده‌ای دارد که از آن انواع آنزیم‌ها و مواد هضم‌کننده‌ی غذا ترشح می‌شود. غذا پس از ورود به معده برای چند ساعت در آن توقف کرده و در این مدت دچار هضم شیمیایی و فیزیکی با حرکات معده می‌شود. سپس برای هضم بیشتر و جذب، وارد روده کوچک می‌گردد. ترشح موکوس محافظتی غلیظ از برخی سلول‌های معده، مانع آسیب دیدن آن‌ها در برابر اسید می‌شود.

۱-۸-سرطان[1]:

سرطان گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه‌ی آنها رشد تنظیم نشده و تهاجم و انتشار سلول‌ها از یک نقطه اصلی به نقاط دیگر بدن است. هر بافت منشا و ویژگی‌های متمایزی را به سلول‌های سرطانی آن ناحیه می‌بخشد (Pecorino 2012). سرطان یکی از بزرگ ترین عوامل مرگ و میر در جوامع

[1] -Cancer

انسانی است. در اروپا و آمریکای شمالی یک نفر از هر ۴ نفر بر اثر سرطان جان خود را از دست می‌دهد (Alberts, Johnson et al 2010). هدف از تحقیق در زمینه‌ی سرطان توسعه‌ی روش‌های جدید و موثر غیر سمی در درمان سرطان است. با توجه به مکانسیم‌های مولکولی در گیر در سرطان‌زایی که در هر نوع سلول سرطانی وجود دارد درمان‌های متفاوتی نیز باید به کار گرفته شود (Pecorino 2012). سرطان تقسیم غیر قابل کنترل سلول‌ها می‌باشد که حاصل اثر عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی است (Wang Ellis et al. 1999, Alberts, Johnson et al. 2010).

۱-۹-سرطان معده:

سرطان معده سومین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است. علارغم کاهش میزان بروز آن در سراسر جهان، سرطان معده همچنین یک چالش بالقوه مهم است. زیرا اکثر موارد در مرحله‌ی پیشرفته تشخیص داده می‌شوند و گزینه‌های درمان محدود می‌شود شایع‌ترین علت بروز سرطان عفونت هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. و عفونت ویروس Epstein-Barr مشکوک به دخالت در سرطانی شدن می‌باشد.عوامل اصلی مستعد کننده شامل مصرف زیاد نمک، سیگارکشیدن و عنصر ژنتیکی خانوادگی است.پیشگیری اولیه به طور مثال ریشه‌کن سازی هلیکوباکترپیلوری[1] به طور فزاینده توصیه می‌شود. علارغم پیشرفت در مطالعه تغییرات فنوتیپی و مکانسیم‌های مولکولی هنوز بیومارکرهای قابل اعتماد برای پیشگیری سرطان معده وجود ندارد.

سرطان معده زمانی عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در آمریکا بود. اما وقوع آن در کشورهای در حال توسعه طی چند دهه‌ی گذشته کاهش یافته است. این بیماری عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بسیاری از کشورهای در حال توسعه باقی مانده است (Pecorino 2012).

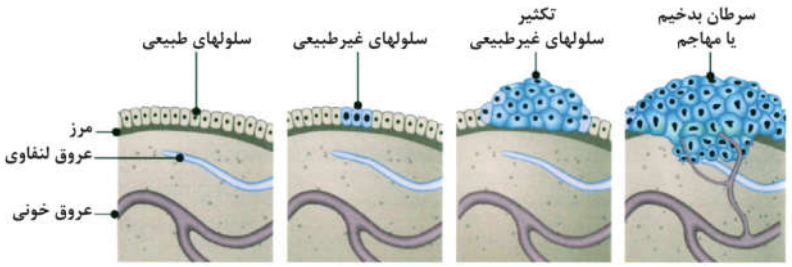
سرطان معده بیشتر به دنبال التهاب‌های مزمن ایجاد می شود. یک عامل مهم ایجاد کننده‌ی باکتری هلیکوباکترپیلوری است که بیماری زخم معده را ایجاد می‌کند. سرطان معده بخصوص در

[1] -Helicobacter pylori

کشورهای در حال توسعه که عفونت با هلیکوباکتر در اوایل زندگی در آنها بالا است شایع می‌باشد.آسیب التهابی گاستریت مزمن مقدمه‌ی ایجاد سرطان می‌باشد.

سرطان معده، سرطان شایعی در سرتاسر جهان است که میزان آن در برخی کشورها چون ایران به مراتب بالاتر از متوسط جهانی است. ژاپن، کره جنوبی، چین، شیلی و کاستاریکا میزان بالایی از مبتلایان را به خود اختصاص داده اند. محققان علت این امر را عادات و روش‌های غلط زندگی عنوان می‌کنند.

سرطان معده، چهارمین سرطان شایع دنیا و یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها محسوب می‌شود. در سال۲۰۱۱ حدود ۳۹۰ هزار مورد جدید در سرتاسر دنیا شناسایی شد که از این میزان نزدیک به ۷۰۰ هزار نفر به کام مرگ رفته‌اند.در ایالات متحده آمریکا، سالانه ۲۲ هزار مورد سرطان معده تشخیص داده می‌شود که بیش از ۱۱ هزار نفر از آن‌ها جان خود را از دست می‌دهند. میزان بروز این سرطان در میان چینی‌ها بیش از دوبرابر سایر نقاط جهان است و بر اساس آخرین آمار سازمان بهداشت جهانی در حدود نیمی از سرطان‌های معده جهان در چین کشف می‌شوند.



شکل ۱-۲: مراحل ایجاد سرطان

۱-۹-۱-انواع سرطان معده:

سرطان معده بر دو نوع اصلی طبقه‌بندی می‌شود:

۱)آدنوکارسینوم[1] نوع روده‌ای: این نوع از سرطان معده را به این علت نوع روده‌ای می‌خوانند که ضایعاتی شبیه به سرطان روده بزرگ به وجود می‌آورد. به نظر می‌رسد این نوع از سرطان، از سلول‌های

[1] -Adenocarcinoma

مخاطی معده به وجود می‌آید که در اثر التهاب مزمن دچار این تغییر شده‌اند. آدنوکارسینوم نوع روده‌ای در جمعیت‌های با خطر بالا شایع‌تر است. این سرطان معمولاً پس از ۵۰ سالگی بروز می‌یابد. کارسینوم نوع روده‌ای در طی ۶۰ سال گذشته در ایالات متحده کاهش پیش رونده‌ای داشته است.

۲)آدنوکارسینوم منتشر: این نوع از سرطان معده نیز از سلول‌های مخاطی معده منشأ می‌گیرد اما مانند نوع قبل التهاب معده در آن نقشی ندارد و بیشتر تمایل دارد به صورت منتشر و تک سلولی یا گروه‌های کوچک سلولی گسترش پیدا کند. سرطان منتشر در طی ۶۰ سال اخیر بر خلاف نوع روده‌ای تغییر مهمی نکرده است و در حال حاضر نیمی از سرطان‌های معده را تشکیل می‌دهد.

سرطان دستگاه گوارش حدود ۲۰ درصد از همه‌ی موارد سرطان‌ها را در سراسر جهان به خود اختصاص داده است (Roy and Othieno 2011, Salhia, Tapia et al 2011).التهاب و عفونت‌ها با ۱۵ تا ۲۰ درصد از بدخیمی‌ها در جهان مرتبط هستند و از عوامل مستعد کننده‌ی ابتلا به سرطان‌های دستگاه گوارش محسوب می‌شوند (Kumar, Kumar et al. 2008, Jemal, Siegel et al. 2010).

هلیکوباکترپیلوری یکی از پاتوژن‌های موفق است که سلول‌های اپیتلیال معده را آلوده می‌کند. و ازسوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان سرطان‌زای درجه یک طبقه‌بندی شده است. در کشورهای توسعه یافته عفونت هلیکوباکترپیلوری کمتر از ۵۰ درصد جمعیت بالغین و در کشورهای در حال توسعه میزان این عفونت بالاتر است و نزدیک به ۸۰ درصد جمعیت بالغ را در بر می‌گیرد. یک سلول طبیعی ممکن است در مواجه مکرر با عوامل سرطان زا دچار جهش یا تغییر شده و به سلول سرطانی تبدیل شود. در این شرایط شکل ظاهری و نیز عملکرد این سلول‌ها متفاوت شده و عملکرد طبیعی خود را از دست می‌دهند. مواد شیمیایی، اشعه‌ی آفتاب ،امواج کوتاه ویروس‌ها و باکتری‌ها هم در تولید انواع سرطان‌ها نقش دارند. از میان عوامل میکروبی مولد سرطان، شاخص‌ترین باکتری که در سرطان‌زایی مطرح است، هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. هلیکوباکترپیلوری عامل گاستریت مزمن، زخم معده و سرطان معده می‌باشد. اخیرا هلیکوباکترپیلوری به عنوان عامل کارسینوژن درجه یک در معده‌ی انسان طبقه بندی شده است.

۱-۱۰-روش‌های مختلف درمان سرطان

یک سوم سرطان ها اگر در مراحل اول تشخیص داده شوند، قابل درمان می‌باشند باتوجه به ماهیت پیچیده بیماری سرطان و درگیری چندین ژن در بروز چنین ناهنجاری، راهکارهای متفاوتی برای درمان آن در نظر گرفته می‌شود (بنیاد بین المللی سرطان)[۱].

۱-۱۱-روش های متداول درمان سرطان

جراحی – پرتودرمانی - شیمی درمانی

جراحی: جراحی موثرترین و سریع‌ترین روش درمان برای تومورهایی است که در مراحل اولیه‌ی رشد هستند و هنوز گسترش نیافته‌اند (متاستاز نداده‌اند). این تنها راه قابل اعتماد برای حذف کامل یک تومور است. با این حال، تضمینی در برداشته شدن کلیه‌ی بخش‌های میکروسکوپی تومور که ممکن است گسترش یافته باشد وجود ندارد. به همین دلیل ممکن است جراحان بخش‌های بزرگتری از بافت‌های سالم اطراف تومور را نیز بردارند. احتمال دارد انجام این کار برای تومورهایی که در لایه‌های نزدیک یا درون بافت‌های اساسی قرار دارند، نظیر اعصاب یا اندام‌ها، غیرممکن باشد. (خدابخشی،و همکارن ۱۳۸۹)

پرتودرمانی: درمان‌های مبتنی بر رادیولوژی[۲]، از ذراتی با امواج پرقدرت نظیر اشعه‌های X یا اشعه‌های گاما بهره می‌گیرند. این امواج تخریب کننده به منظور ایجاد آسیب‌های ژنتیکی روی تومور پرتوافکنی می‌کنند که این کار باعث مرگ سلول سرطانی می‌شود. پرتودرمانی نه تنها به سلول‌های سرطانی بلکه به سلول‌های سالم نیز به سرعت آسیب می‌زند، هرچند که این سلول‌ها فورا از نو ساخته می‌شوند. برخلاف جراحی، پرتودرمانی می‌تواند سلول‌های سرطانی میکروسکوپی را که در اطراف بافت‌ها تجمع می‌کنند، از بین ببرد. (خدابخشی،و همکاران ۱۳۸۹)

شیمی درمانی: در شیمی درمانی از داروهای پرقدرت ضد سرطان که از طریق جریان خون انتقال می یابند، استفاده می‌شود. این درمان به طور بالقوه برای سرطان‌هایی که گسترش یافته‌اند مفید است.

---

[۱]- Cancer Institute National

[2] -Radiologie

سرطان‌شناسان از ۵۰ نوع گوناگون داروهای شیمی درمانی برای مبارزه با سرطان بهره می‌گیرند و عموما بیش از یک دارو در هر زمان استفاده می‌کنند، چون این داروها وقتی باهم ترکیب می‌شوند بسیار قوی عمل می‌کنند. خوردن یا تزریق کردن داروهای شیمی درمانی به جریان خون باعث می‌شود که توانایی ساخت DNAی جدید در سلول‌های سرطانی مختل شود یا از تقسیم کامل سلول‌های سرطانی جلوگیری به عمل آید. (خدابخشی،و همکاران ۱۳۸۹)

۱-۱۲-روش‌های نوین درمان سرطان

هورمون درمانی: بعضی از انواع سرطان‌ها، نظیر سرطان پستان[۳] و پروستات[۴]، رشدشان بستگی به هورمون‌های جنسی دارد. هورمون درمانی از رسیدن یا مصرف هورمونی که سلول‌های سرطانی به آن‌ها احتیاج دارند جلوگیری می‌کند. هورمون درمانی ممکن است شامل جراحی برای برداشتن اندام‌هایی در سیستم درون ریز بدن باشد که تولید کننده‌ی هورمون‌ها هستند. در سایر موارد، هورمون درمانی بر مبنای استفاده از داروهایی است که یا از تولید هورمون جلوگیری می‌کنند یا مسیر کارکرد هورمون را تغییر می‌دهند. (خدابخشی،و همکاران ۱۳۸۹)

ایمنی درمانی: ایمنی درمانی یا به عبارت دیگر درمان زیستی، از سیستم ایمنی بدن برای مبارزه با سلول‌های سرطانی یا حفاظت از بدن در برابر تاثیرات جانبی استفاده می‌کند. ایمنی درمانی بر عوامل محافظ بدن یعنی آنتی بادی‌ها تکیه دارد که به طور طبیعی با تولید پروتئین در جهت دفاع از بدن در برابر تعرض مواد خارجی عمل می‌کنند. در یک نوع ایمنی درمانی ، از آنتی بادی‌ها برای حمله‌ی مستقیم به سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود، در حالی که در روش دیگر از آنتی بادی‌ها برای انتقال مواد سمی، نظیر مواد رادیواکتیو یا داروهایی که به طور گزینشی سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند، استفاده

[3] -Breast cancer
[4] -Prostate

می‌شود. آنتی بادی‌های مونوکلونال[5]، آنتی بادی‌هایی هستند که در آزمایشگاه ساخته می‌شوند و برای مبارزه با بسیاری از بیماری‌ها، نظیر سرطان به کار برده می‌شوند. (خدابخشی،و همکاران ۱۳۸۹)

Alternative therapy: این نوع درمان، به‌کارگیری روش‌های درمانی غیرمرسوم در علم پزشکی ازجمله استفاده از پتانسیل بالای پزشکی سنتی و به‌کارگیری ترکیبات گیاهی و قارچی مرتبط، جهت درمان سرطان را شامل می‌شود (Cassileth & Deng, 2004).

سایر روش‌ها: شامل استفاده از تکنولوژی‌های سلول‌درمانی، ژن درمانی، فناوری نانو و غیره می‌باشد.

۱-۱۳- استفاده از محصولات طبیعی در سرطان

عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در طب سنتی شامل برخی موارد زیر می‌باشد:

Selaginella temariscina (علف خوک): یک گیاه دارویی سنتی برای درمان بیماران مبتلا به سرطان در شرق است. لیو و همکارانش نشان دادند این گیاه به طور موثر می‌تواند فعالیت ژن P53 را افزایش دهد و باعث آپوپتوز در رده سلولی U-937 شود (Lee et al., 1998).

Solaum muricatum (عصاره بادمجان): باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پروستات، معده و ریه می‌شود (Ren & Tang, 1998).

Green tea: چای سبز حاوی پلی‌فنل‌های EGCC، EGC، ECG، EC می‌باشد که رشد سلول‌های سرطانی ریه انسان را مهار می‌کند. پلی‌فنل‌های چای سبز باعث تحریک آپوپتوز خطوط مختلف سلول‌های سرطانی مانند پروستات، روده بزرگ و ریه می‌شود (Chung et al., 2001).

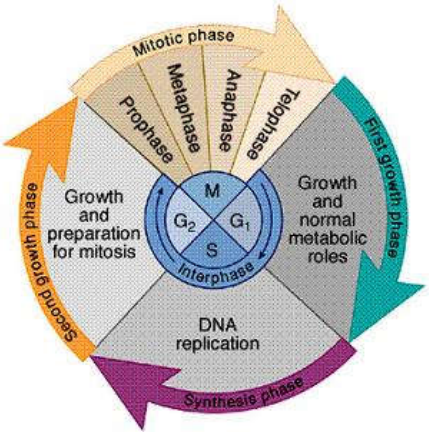
مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که سرطان معده به شیمی درمانی و رادیو درمانی مقاوم است بنابراین بهترین روش پیشنهاد شده جراحی است.در طی سال‌های اخیر به علت پیشرفت روش‌های

[5] -Monoclonal

تشخیصی و درمانی، شانس بقای بیماران سرطانی که در مراحل اولیه‌ی سرطان هستند بالا می‌باشد اما سرطان معده اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود.

۱-۱۴-چرخه ی سلولی :

تقسیم یک سلول نرمال و خود تکثیری تحت تاثیر سیگنالینگ خارج سلولی است.پس از شروع تقسیم تکثیر DNA باید تمام شود.بنابراین، سیگنال‌های خارج سلولی از جمله فاکتورهای رشد[۶] (GF) نباید پیشرفت فاز (S) فاز تکثیر را متوقف کنند. بعد از اینکه سنتز DNA کامل می‌شود سلول‌ها جهت آماده‌سازی برای میتوز[۷] وارد فاز G2 می‌شوند. اکثر سلول‌های پستانداران دیپلوئید هستند، بنابراین پس از تکثیر DNA سلول‌ها نیز باید تقسیم شوند.بنابراین کنترل در فاز G2 توسط فاکتور رشد (GF) غیر ضروری است .این نقاط کنترلی برای رویداد سیگنالینگ داخل سلول ضرروی است. مرحله‌ی میتوز توسط مسیرهای سیگنالی کنترل شده است، که می‌تواند بر یکپارچگی عملکرد میکروتوبول‌ها نظارت داشته باشند. برای اطمینان از این که تفکیک کروموزوم به طور کامل انجام می‌شود. میتوز یک مرحله مستقل از GF چرخه‌ی سلولی است. در حالی که سلول از چرخه‌ی میتوز خارج شود، چرخه‌ی سلولی تنظیم مجدد پیدا می‌کند. اجازه می‌دهد یک سلول جدید ایجاد شود. در حالی که منطق حکم می‌کند، شروع فاز G1 تنها بخشی از چرخه‌ی سلولی است که می‌تواند وابسته به GF باشد (شکل ۱-۳)



شکل ۱-۳: مراحل چرخه سلولی

[6] -Growth factor
[7] -Mitose

۱-۱۴-۱-تنظیم چرخه‌ی سلولی :

پروسه‌ی عبور از یک مرحله به مرحله بعد به طور دقیق و با تشکیل، فعال شدن، تخریب و یا تغییرات پروتئین‌هایی به نام کینازهای وابسته به سایکلین (CDK) کنترل می‌شود. به علاوه اخیرا گروه دیگری از پروتئین‌ها به نام مهارکننده‌های کینازهای وابسته به سایکلین (CKIs) شناخته شده‌اند که برای انتقال پیام و هماهنگی هر مرحله از چرخه سلولی ضروری می‌باشند (Vermeulen, Van Bockstaele et al 2003). تعدادی از نقاط بازرسی شناخته شده است که یکپارچگی DNA و تشکیل دوک‌های میتوزی را بازرسی می‌کند (Nigg 2001).

نقص در دوک قطبی منجر به تغییر در پلوئیدی[8] می‌گردد. اولین نقطه بازرسی در سلول‌های پستانداران به عنوان START یا نقطه بحرانی در اواخر G1 قرار دارد (Ho and Dowdy 2002).که در این مرحله سلول‌ها باید شروع به همانندسازی و تکثیر DNA کنند. در این نقطه هرگونه آسیب وارد شده به DNA تحت نظارت درآمده و درصورت نیاز چرخه تا زمان ترمیم، متوقف می‌شود. نقاط بازرسی دیگر در طی فاز S و عبور از G2 به M برای نظارت در اتمام سنتز DNA و تشکیل دوک عملکردی قرار دارد. تخریب سایکلین‌های مختلف در هر نقطه بازرسی انجام می‌گیرد که اجازه عبور به مرحله بعدی را می-دهد. در ابتدا براین باور بودند که اساس مکانیسم چرخه سلولی در تومورزایی نقشی ندارد اما اکنون روشن شده که این اشتباه است. نقاط بازرسی در تومورها و سلول‌هایی که در ژن‌های دخیل در چرخه سلولی، دارای جهش می‌باشند، از کنترل خارج شده و منجر به ناپایداری ژنومی و سرطان می‌شود.

سایکلین‌های نوع D اولین سایکلین القاکننده سلول‌های فاز G0 برای ورود به چرخه سلولی هستند (Sherr 1994) سایکلین نوع D با CdK6 و CdK4 همراه شده و آن‌ها را فعال می‌کنند (Sicinski, Donaher et al. 1995). سوبسترای اولیه کیناز سایکلین نوع D، پروتئین سرکوب کننده تومور رتینوبلاستوما (Rb) می‌باشد. در سلول‌هایی با فقدان Rb فعالیت کینازی سایکلین نوع D برای پیشبرد چرخه‌ی سلولی نیاز نیست (Lukas, Bartkova et al. 1995).زیرواحدهای Cdk6 و Cdk4 علاوه بر

[8] -Polyploidy

Family name: Pasban Khosroshahi Name: Sepideh

Title of Thesis: The study of interaction of Helicobacter pylory and AGS cell line in a cocculture system

Supervisor(s): Saber Zahri (Stands Professor)، Saeid Latifi-Navid (PH.D)

Advisor(s): Ezzat Nourizadeh (PH.D)

Graduate Degree: **M.Sc.**

Major: Biology Specialty: Cell &Molecular Biology

University: **Mohaghegh Ardabili** Faculty: Faculty of Science

Graduation date: 2018/1/10 Number of pages: 97

Abstract:

*Helicobacter P*ylori is a pathogenic bacterium, witch lead to a variety of gastritis disease, including mild to severe gastritis and gastric ulcers. In the early stage of infection, attachment of *Helicobacter P*ylori to epithelial cells at special niches leads to secretion of chemokines and cytokines. The purpose of this study was the effects of *Helicobacter P*ylori coculture and its derivatives effects on AGS cell line viability and apoptosis and proliferation. The *Helicobacter P*ylori strain was determined as *Cag*+ and some alles of *Vac (D2+,C2+ and i1+)* , by specific PCR for *Cag* and *Vac* genes, and a strain of *Escherichia coli* were used as control. The bacterial population density was adjusted by Mcfarland standards in order to coculture preparation and protein concentration was determined by Bradford's method. The cells' viability and apoptosis were carried out by MTT method and AO/EB staining, respectively. In comparison with the control tests, the *Helicobacter P*ylori coculture and extracted total protein administration, not only did not kill the cells, but also lead to mild increase in the cell viability. Unlike the main tests, the fluorescent images showed extensive cell death on the control examinations(*E-coli* treatment). However, the LPS extracts of the tests and controls lead to decrease in viability and increase in necrotic cell death.

Keywords: AGS, *E-coli*, Helicobacter pylori,MTT

University of Mohaghegh Ardabili

Faculty of sciences

Department of Biology

Thesis is approved for the degree of M.Sc.

In Cell and Molecular Biology

Title:

The Study of Interaction of Helicobacter Pylory and AGS Cell Line in a Cocculture System

Supervisor(s):

Prof.Saber Zahri

Dr.S.Latifi-Navid

Advisor(s):

Dr.Ezzat Nourizadeh

By:

Sepideh Pasban Khosroshahi

January – 2018