مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۶/هفته اول مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۴

تأثیر کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های شبه کرومافین و مولد گاسترین در معده‌ی موش صحرایی

محمدعلی رضایی[۱]، دکتر محمدجعفر رضایی[۲]، دکتر محمدرضا رحمانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های شبه کرومافینی (Enterochromaffin like cells یا ECL cells) و سلول‌های مولد گاسترین (G یا Gastrine) نقش مهمی در عملکرد بافت معده دارند. کلونیزه شدن هلیکوباکترپیلوری در معده بر عملکرد و تعداد این سلول‌ها مؤثر است. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر میان مدت (۲۰ هفته‌ای) کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های ECL و G در معده‌ی موش صحرایی بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی آزمایشگاهی، ۱۰ سر موش صحرایی به صورت تصادفی در دو گروه مورد و شاهد قرار گرفتند. موش‌های گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب هلیکوباکترپیلوری و PBS (Phosphate buffered saline) را به مدت ۲۰ هفته از طریق گاواژ دریافت کردند. پس از این زمان، کلونیزاسیون باکتری و خصوصیات هیستوپاتولوژی بافت معده با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و گیمسا مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های ECL و G بافت معده‌ی موش‌ها در دو گروه به ترتیب با رنگ‌آمیزی نقره و روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: ۲۰ هفته پس از گاواژ هلیکوباکترپیلوری، کلونیزاسیون باکتری در بافت معده‌ی موش صحرایی با رنگ‌آمیزی گیمسا تأیید شد. در گروه مورد، تغییرات هیستوپاتولوژی شامل دیس ارگانیزاسیون اپی‌تلیومی، واکوئلیزاسیون اپی‌تلیومی، بی‌نظمی در فضای لامیناپروپریا و اپی‌تلیوم معده با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین مشاهده شد. رنگ‌آمیزی نقره نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های ECL در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۱/۷۹ ± ۱۱/۷۶ و ۱/۳۴ ± ۸/۳۵ سلول در واحد حجم بود ($P < ۰/۰۰۱$). میانگین تعداد سلول‌های G در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نیز در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۱/۲۱ ± ۶/۷۴ و ۰/۸۴ ± ۳/۶۵ سلول در واحد حجم بود ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که با کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در معده‌ی موش صحرایی در مراحل قبل از القای سرطان در معده، آسیب‌های بافتی دیس ارگانیزاسیون و واکوئلیزاسیون اپی‌تلیومی، بی‌نظمی در فضای لامیناپروپریا و اپی‌تلیوم معده رخ می‌دهد و تعداد سلول‌های ECL و G افزایش می‌یابد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، سلول شبه کرومافینی، سلول مولد گاسترین، ایمونوهیستوشیمی

ارجاع: رضایی محمدعلی، رضایی محمدجعفر، رحمانی محمدرضا. **تأثیر کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های شبه کرومافین و مولد گاسترین در معده‌ی موش صحرایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۶): ۱۲۴۹-۱۲۳۸

۱- مربی، گروه ایمنی‌شناسی و خون‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۲- دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۳- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی و خون‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمدجعفر رضایی
Email: rezaiemjafar@gmail.com

مقدمه

سرطان معده از مهم‌ترین سرطان‌ها در جوامع مختلف به شمار می‌رود و میزان مرگ و میر آن بالا است (۲-۱). این سرطان در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران نسبت به کشورهای پیشرفته شیوع بیشتری را نشان می‌دهد (۳-۲). عوامل متعددی در ایجاد سرطان معده نقش دارند که یکی از مهم‌ترین این عوامل، عفونت معده با باکتری هلیکوباکترپیلوری است (۵-۴). عفونت هلیکوباکترپیلوری در ردیف مهم‌ترین عوامل سرطان‌زا معرفی شده است (۶). در کشورهای در حال توسعه مانند ایران، میزان عفونت به این باکتری به صورت کلی ۷۰-۶۰ درصد می‌باشد (۷). کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در معده سبب ایجاد تغییرات تخریبی در بافت می‌شود و یکی از شایع‌ترین این تغییرات، گاستریت آتروفی است (۸).

با وجود مطالعات متعددی که در زمینه‌ی خصوصیات هیستوپاتولوژی سرطان معده صورت گرفته است، هنوز مکانیسم‌های آغازین سرطان معده مورد بحث است. در خصوص وقایع سلولی ایجاد سرطان مرتبط با کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری، اطلاعات زیادی در دست نیست. نکته‌ی مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد، این است که کلونیزاسیون باکتری در محیط اسیدی معده انجام نمی‌گیرد و عملکرد صحیح سلول‌های پاریتال به عنوان سلول‌های مولد اسید، مانع از کلونیزاسیون این باکتری و عوارض ناشی از آن می‌شود (۱۰-۹).

در مدل حیوانی، عفونت هلیکوباکترپیلوری در معده‌ی موش صحرایی در میان مدت و قبل از القای سرطان، تغییرات تخریبی در سلول‌های پاریتال معده را باعث شده است (۱۱-۱۰). در این مطالعات، اثر هلیکوباکترپیلوری بر سایر سلول‌های مهم بافت معده مانند سلول‌های ECL (Enterochromaffin like cells) و G (Gastrine) مورد بررسی قرار نگرفته است و راجع به تغییرات احتمالی این سلول‌ها طی کلونیزاسیون و عفونت این باکتری اطلاعات قابل توجهی در دست نیست.

سلول‌های پاریتال از سلول‌های غددی معده محسوب می‌شوند. این سلول‌ها در پاسخ به هیستامین مترشحه از سلول‌های ECL از طریق گیرنده‌های H۲، اسید ترشح می‌کنند. در صورتی که سلول‌های پاریتال دچار آسیب شوند، سلول‌های مولد گاسترین (یکی از انواع ECL) به صورت جبرانی گاسترین بیشتری را تولید می‌کنند که هایپرگاسترینمی را ایجاد می‌کند. گاسترین با اثر بر سلول‌های ECL، آن‌ها را وادار به ترشح هیستامین می‌کند. از آن جا که گاسترین اثرات تروفیکی دارد، می‌تواند باعث تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی مخاط معده شود و یکی از عوامل مستعد کننده‌ی ایجاد سرطان باشد (۱۳-۱۲).

سلول‌های ECL نوعی از سلول‌های غددی اندوکرینی معده هستند و در حدود ۳-۱ درصد حجم اپی‌تلیومی نواحی معده را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها، ارتباطات پاراکرینی با سلول‌های پاریتال دارند و مطالعاتی که در سرطان‌های دستگاه گوارش صورت گرفته است، نشان داده است که در روند سرطانی شدن معده، سلول‌های ECL نیز نقش دارند و ۷۵-۱۷ درصد سرطان‌های دستگاه گوارش، همراه با کارسینوئید معده است (۱۴). سلول‌های ECL سلول‌های حساسی هستند و جمعیت آن‌ها در پاسخ به التهاب معده و ناکارایی سلول‌های پاریتال، افزایش می‌یابد (۱۵).

سلول‌های ECL در اثر جراحی معده، تغییرات pH و حضور غذا تحریک می‌شوند و شروع به فعالیت می‌کنند. یکی از سلول‌های ECL، سلول مولد گاسترین است که به عنوان سلول G شناخته می‌شود. این سلول‌ها به دلیل ترشح گاسترین (به عنوان عامل رشد) شاید در روند تکثیر، متاپلازی و سرطانی شدن بافت‌های اپی‌تلیالی معده نقش مهمی دارند و یافته‌ها دال بر آن است که در بیمارانی که دچار کارسینوئید معده هستند، جمعیت سلول‌های ECL افزایش می‌یابد. به ویژه به دنبال هایپرگاسترینمی، هایپرپلازی سلول‌های ECL به میزان بیشتری رخ می‌دهد (۱۷-۱۶).

در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در دراز مدت و در زمان بیش از ۴۰ هفته، منجر به تکثیر سلول‌های ECL معده و در نهایت آدنوکارسینوما و کارسینوئید معده می‌شود (۱۹-۱۸)، اما در خصوص تأثیر میان مدت کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های ECL و سلول‌های گاسترین معده، با وجود نقش مهم این سلول‌ها در عملکرد بافت معده، گزارشی یافت نشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات میان مدت کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های ECL و سلول‌های گاسترین معده‌ی موش صحرایی بود.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، موش صحرایی ماده‌ی بالغ نژاد اسپراگ- داولی ۸-۶ هفته‌ای در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۰۰ g از مؤسسه‌ی رازی خریداری و در شرایط استاندارد نور و دما در حیوان‌خانه‌ی دانشگاه علوم پزشکی کردستان تا زمان آزمایش نگهداری شدند. موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه شاهد و مورد (هر گروه ۱۰ سر)، تقسیم و در قفس‌های حاوی آب و مواد غذایی اتوکلاو شده نگهداری شدند (۲۰-۱۹). این پژوهش بر اساس قوانین بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

سویه‌ی هلیکوباکترپیلوری از مرکز انستیتو پاستور تهران تهیه شد. با استفاده از محیط کشت بروسلا آگار (Merck, Germany) حاوی ۷-۵ درصد خون تازه‌ی گوسفندی و تحت شرایط میکروآئروفیل در دمای ۳۷ ^{o}C به مدت ۷-۵ روز، باکتری کشت داده شد (۱۱).

از کشت تازه‌ی هلیکوباکترپیلوری رشد یافته روی محیط بروسلا آگار دارای ۵ درصد خون گوسفندی، برای تهیه‌ی سوسپانسیونی به میزان 1×10^{9} CFU/ml (Colony forming unit/milliliter) در بافر PBS (Phosphate buffered saline) استفاده گردید. ۰/۱ ml از این سوسپانسیون برای گاواژ به موش صحرایی در نظر گرفته شد (۱۸، ۱۱).

به موش‌های صحرایی گروه مورد، ۰/۱ ml از سوسپانسیون میکروبی که حاوی 1×10^{8} هلیکوباکترپیلوری سه بار در روز، یک روز در میان به مدت ۲۰ هفته گاواژ شد. گروه شاهد نیز با همین شرایط با محلول PBS استریل گاواژ گردید. پس از بیست هفته، موش‌ها با استفاده از اتر بیهوش شدند و از معده‌ی موش‌های شاهد و مورد برای انجام آزمایش‌های بعدی نمونه‌برداری شد (۱۸، ۱۱).

برای تأیید عفونت موش‌های گروه مورد با هلیکوباکترپیلوری، حدود ۳ mm^{3} از آنتروم معده در انحنای بزرگ‌تر معده برداشته شد و با استفاده از PBS ۰/۱ mol/l استریل، هموژنیزه شد. بخشی از نمونه‌ی یکنواخت شده، روی محیط بروسلا آگار

دارای آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین (Merck, Germany) ۲۰ mg/ml، نالیدیکسیک اسید (Merck, Germany) ۱۰ mg/ml، باکتریوسین (Merck, Germany) ۳۰ mg/ml و آمفوتریسین B (Merck, Germany) ۲ mg/ml کشت داده شد و به مدت ۵ روز در شرایط میکروآئروفیل انکوبه گردید. برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری از رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. همچنین روی کلنی‌های رشد یافته، فعالیت اوره‌آزی، کاتالازی، اکسیدازی، مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید، عدم تولید SH۲ (Src Homology۲) بررسی و آزمایش اندول انجام شد (۱۱).

جهت بررسی‌های بافت‌شناسی، یک برش طولی از معده در امتداد خم بزرگ معده از مری تا دوازدهه، داده شد و نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. در نهایت، نمونه‌ها در برش‌هایی به ضخامت ۶ µm جهت مطالعات بافت‌شناسی تهیه شدند. اسلایدها با رنگ‌های هماتوکسیلین- ائوزین و گیمسا جهت مطالعات بافتی و وجود کلونیزاسیون باکتری رنگ‌آمیزی شدند. با استفاده از رنگ آمیزی نقره، نمونه‌های بافتی معده جهت تشخیص سلول‌های ECL رنگ‌آمیزی شدند (۲۱).

جهت بررسی بیان پروتئین گاسترین در برش‌های بافتی معده، از تکنیک ایمونوهیستوشیمیایی استفاده شد. از بلوک‌های بافتی در پارافین جامد مقاطعی به ضخامت ۶ µ تهیه و روی لام‌های سیالنیزه (Sigma, USA) از قبل آماده شده، قرار داده شدند. سپس اسلایدها در فور در دمای ۶۰ ^{o}C قرار گرفتند و در سه مرحله پارافین‌زدایی و آب‌دهی شدند. در مرحله‌ی بازیابی آنتی‌ژن، برش‌های بافتی در بافر سیترات به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ ^{o}C قرار داده شد و به منظور توقف فعالیت پراکسیداز داخلی، از آب اکسیژنه‌ی ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد.

به منظور خنثی کردن پروتئین‌های اضافی، محلول آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) ۲ درصد (پارس توس، ایران) به کار برده شد و بعد نمونه‌ها به مدت یک شب با آنتی‌بادی اولیه‌ی اختصاصی ضد گاسترین موشی (Abcam, England) با رقت ۱/۲۵۰ و در دمای ۴ ^{o}C انکوبه شدند. پس از این زمان شستشو صورت گرفت و آنتی‌بادی ثانویه (Abcam, England) با رقت ۱/۶۰۰ به مدت ۱ ساعت اضافه شد. پس از شستشو، نمونه‌ها در محلول دی‌آمینو بنزیدین (DAB یا ۳,۳'-Diaminobenzidine) (Roche, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند و رنگ‌آمیزی مخالف با هماتوکسیلین صورت گرفت. سلول‌های بیان کننده‌ی پروتئین گاسترین در دو گروه مورد و شاهد شمارش شدند.

در برش‌های بافتی گروه شاهد منفی، تمام مراحل بالا غیر از اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه انجام شد. برش‌های بافتی معده‌ی موش صحرایی بدون دریافت باکتری و PBS هم به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد.

جهت مطالعات مورفومتریک، از میکروسکوپ نوری با استفاده از گراتیکول صفحه‌ی شطرنجی West و با بزرگنمایی ۲۰۰ (۲۰ عدسی شیئی و ۱۰ گراتیکول)، هفت فیلد در هفت برش سریال با ضخامت ۶ µ و با تناوب ۱ به ۳ مورد بررسی قرار گرفت. مساحت هر فیلد ۱۲۰۰۰ μm^{2} و حجم هر فیلد ۷۲۰۰۰ μm^{3} بود. تعداد سلول‌های ECL و سلول‌های بیان کننده‌ی پروتئین گاسترین در

گروه‌های مورد و شاهد شمارش شد.

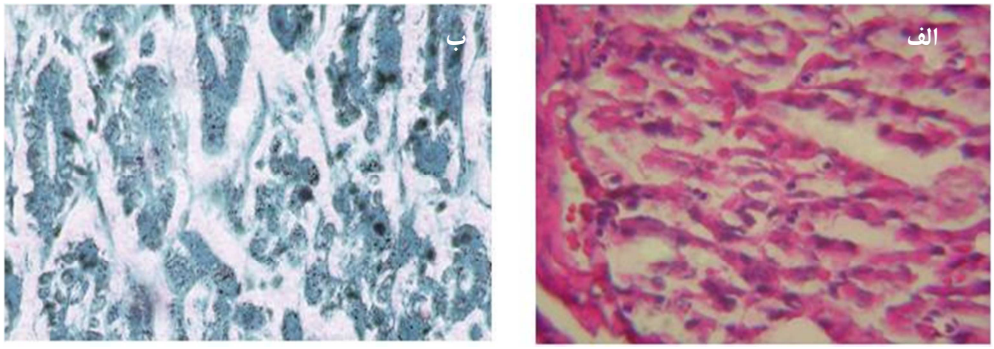
داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۲ (version 12, SPSS Inc., Chicago, IL) شد و با آزمون آماری t، میانگین تعداد سلول‌ها در هر گروه با هم مقایسه شد و $P \leq ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

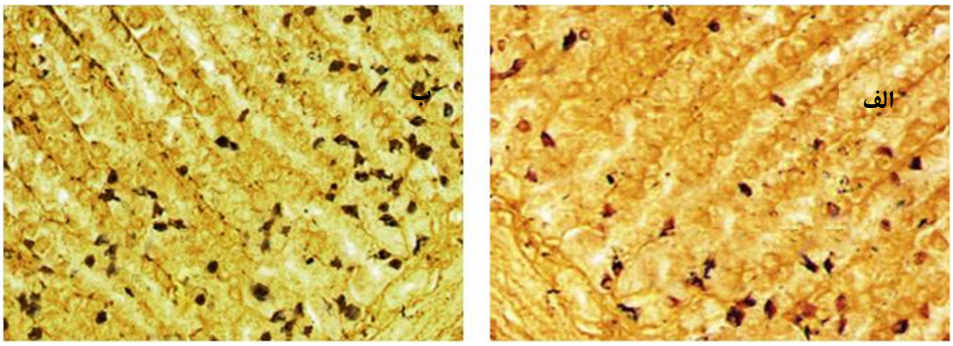
قطعات بافتی آنتروم معده‌ی هر دو گروه، در کیت سریع اوره‌آز در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت قرار داده شد. در گروه مورد، آزمایش اوره‌آز مثبت شد؛ اما در گروه شاهد هیچ تغییری در رنگ کیت اوره‌آز مشاهده نشد. فعالیت اکسیدازی و کاتالازی کلنی‌های حاصل از کشت معده‌ی گروه مورد، مثبت بودند. همچنین بررسی مورفولوژی باکتری‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و عدم تولید SH۲ و آزمایش اندول منفی، دلیل بر وجود هلیکوباکترپیلوری در گروه مورد بود.

در بررسی هیستولوژی گروه شاهد، بافت معده نمایی طبیعی داشت و همه‌ی لایه‌ها قابل تشخیص بود. در لایه‌ی مخاطی، اپی‌تلیوم و در بخش غددی و به ویژه در قسمت‌های قاعده‌ای غدد، تعداد کمی سلول‌های ECL با ظاهری گلابی شکل با سیتوپلاسمی کم رنگ و هسته‌ای متراکم و رنگ پذیرتر از سایر سلول‌ها دیده شد (شکل ۱).

در بررسی هیستولوژی گروه مورد، کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در مخاط معده با رنگ‌آمیزی گیمسا مشاهده شد. در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، شواهدی از دیس ارگانیزاسیون اپی‌تلیومی، واکوئلیزاسیون اپی‌تلیومی، تکثیر سلول‌های گلاندولار، ریزش سلول‌های اپی‌تلیومی در فضای معده، بی‌نظمی در مرز بین لامیناپروپریا و اپی‌تلیوم معده و تهاجم سلول‌های غددی به ویژه در قسمت قاعده‌ای به لامیناپروپریا و لایه‌ی عضله‌ی مخاطی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. در این بررسی‌ها، همچنین ارتشاح لکوسیت‌های تک هسته‌ای و چند هسته‌ای در لایه‌ی مخاطی مشاهده شد و در لایه‌ی آستر مخاط و زیر مخاطی معده در گروه مورد، پرخونی مشهود بود (شکل ۱).



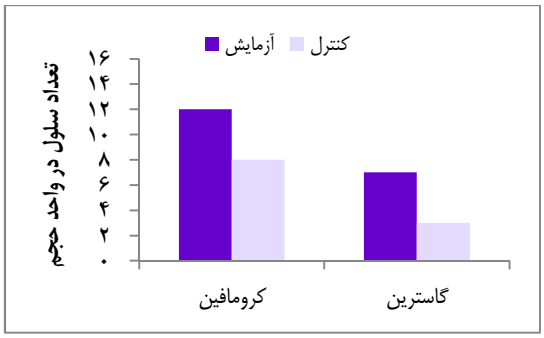
شکل ۱. نتایج رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین- ائوزین و گیمسا در برش‌های بافتی معده. موش‌هایی که هلیکوباکترپیلوری را ۲۰ هفته از طریق گاواژ دریافت کرده بودند (گروه مورد). الف: نمای هیستولوژیک بافت معده در رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین- ائوزین در گروه مورد که در آن واکوئلیزاسیون و دیس ارگانیزاسیون اپی‌تلیومی در لایه‌ی مخاطی دیده می‌شود. ب: نمای بافت معده‌ی گروه مورد در رنگ‌آمیزی گیمسا. نقاط تیره کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در اپی‌تلیوم لایه‌ی مخاطی را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۴۰، میکروسکوپ نوری).



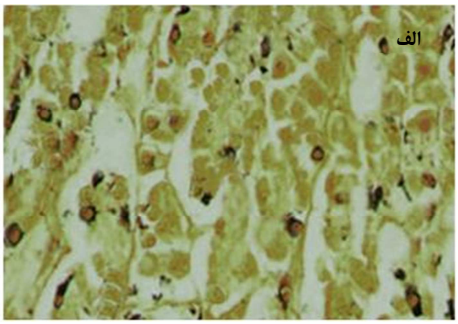
شکل ۲. نتایج رنگ‌آمیزی نقره در برش‌های بافتی معده‌ی موش صحرایی در گروه شاهد که PBS (Phosphate buffered saline) به آن‌ها گاواژ شده بود و گروه مورد که هلیکوباکترپیلوری را ۲۰ هفته از طریق گاواژ دریافت کرده بودند. الف) بافت معده در رنگ‌آمیزی نقره که نقاط تیره نشان دهنده‌ی سلول‌های نقره دوست می‌باشد. ب) بافت معده‌ی گروه مورد. سلول‌های ECL (Enterochromaffin like cells) مثبت به رنگ تیره علاوه بر حضور در نواحی قاعده‌ای بخش غددی مخاط معده در نواحی فوقانی‌تر اپی‌تلیوم هم مشاهده می‌شوند. (بزرگنمایی ۴۰، میکروسکوپ نوری).

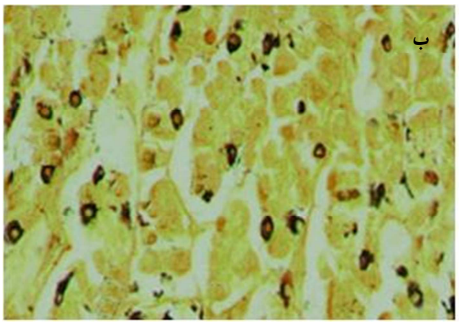
در گروه شاهد، سلول‌های ECL در بخش غددی معده مشاهده شد. این سلول‌ها سیتوپلاسمی با نمایی تیره داشتند و بیشتر در نواحی قاعده‌ای غدد یافت شدند. در گروه مورد، مشاهدات کیفی نشان داد که جمعیت سلول‌های ECL افزایش یافته است. این سلول‌ها نه تنها در نواحی قاعده‌ای غدد، بلکه در نواحی نزدیک به گردن غدد معدی نیز مشاهده شدند (شکل ۲). بررسی‌های مورفومتری نشان داد که تعداد سلول‌های ECL در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۱/۷۹ ± ۱۱/۷۶ و ۱/۳۴ ± ۸/۳۵ سلول در واحد حجم بود که این افزایش تعداد سلول‌های ECL در گروه مورد نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۳).

نتایج ایمونوهیستوشیمی برش‌های بافتی معده برای سلول‌های G در گروه شاهد نشان داد که این سلول‌ها سیتوپلاسم قهوه‌ای رنگ داشتند ودر نواحی قاعده‌ای غدد و به صورت پراکنده یافت می‌شدند. در گروه مورد، مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که جمعیت سلول‌های گاسترین افزایش یافته است و این سلول‌ها علاوه بر نواحی قاعده‌ای غدد، در نواحی گردنی غدد معدی نیز مشاهده شدند (شکل ۴).



شکل ۳. نتایج مورفومتری شمارش سلول‌های ECL (Enterochromaffin like cells) و G (Gastrine) در برش‌های بافتی موش‌های گروه‌های شاهد و مورد که به ترتیب مدت ۲۰ هفته PBS (Phosphate buffered saline) و هلیکوباکترپیلوری را از طریق گاواژ دریافت کرده بودند. نتایج شمارش سلول‌های ECL پس از رنگ‌آمیزی نقره و همین‌طور سلول‌های G پس از انجام ایمونوهیستوشیمی که در نمودار به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. تعداد سلول‌های ECL و G در گروه مورد به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P < ۰/۰۵۰$).





شکل ۴. نتایج آزمایش ایمونوهیستوشیمی برای پروتئین گاسترین در برش‌های بافتی معده‌ی موش صحرایی در گروه‌های شاهد و مورد که به ترتیب PBS (Phosphate buffered saline) و هلیکوباکترپیلوری را ۲۰ هفته از طریق گاواژ دریافت کرده بودند. الف) در برش‌های بافتی معده‌ی گروه شاهد سلول‌های گاسترین مثبت به صورت نقاط تیره مشخص شده است. ب) در گروه مورد، تعداد سلول‌های گاسترین مثبت در برش‌های بافتی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان می‌دهد و این سلول‌ها در این گروه علاوه بر نواحی قاعده‌ای غدد در سایر نواحی اپی‌تلیوم غددی هم مشاهده می‌شود (بزرگنمایی ۴۰، میکروسکوپ نوری).

بررسی‌های مورفومتری نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های G در لایه‌ی اپی‌تلیالی معده به ترتیب در گروه‌های مورد و شاهد ۱/۲۱ ± ۶/۷۴ و ۰/۸۴ ± ۳/۶۵ سلول در واحد حجم بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۳). نسبت سلول‌های G به کل سلول‌های ECL در گروه مورد ۵۷/۴۴ درصد بود؛ در حالی که این نسبت در گروه شاهد ۴۲/۵۶ درصد بود که این نسبت‌ها با هم تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۰۱$).

بحث

نتایج این مطالعه تأثیر میان مدت کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های ECL بافت معده در موش صحرایی را نشان می‌دهد. در ارتباط با این اثر، گزارش‌های کمی وجود دارد و نتایج این مطالعه در روشن‌تر شدن اثرات عفونت هلیکوباکترپیلوری بر سلول‌های ECL معده می‌تواند راهگشا باشد. کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری همراه با مواد شیمیایی در دراز مدت (۴۰ هفته و بیشتر) در مدل حیوانی می‌تواند منجر به سرطان معده شود و سلول‌های ECL به دلیل دارا بودن عوامل رشد، می‌توانند در روند القای سرطان معده مؤثر باشند (۱۹–۱۸، ۸).

نتایج مطالعه‌ی حاضر، حاکی از آن است که تعداد سلول‌های ECL بافت معده‌ی موش صحرایی، ۲۰ هفته پس از کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری نسبت به گروه بدون دریافت هلیکوباکترپیلوری افزایش نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۰۱$). Cao و همکاران نشان دادند که عفونت هلیکوباکترپیلوری معده در مدت بیش از ۵۰ هفته در مدل حیوانی، باعث ایجاد هایپرپلازی، دیس پلازی و کارسینوئید سلول‌های ECL می‌شود و پیشرفت این ضایعات به شکل معنی‌داری با سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد هلیکوباکترپیلوری ارتباط مستقیمی دارد (۱۹).

Zhao و همکاران نیز گزارش کردند که عفونت هلیکوباکترپیلوری در معده‌ی موش C۵۷BL/۶J در مدت ۹ ماه باعث افزایش تعداد، هایپرتروفی و

هایپرپلازی سلول‌های ECL می‌شود. همچنین در معده‌ی موش‌های دارای عفونت، تعداد سلول‌های پاریتال و همین‌طور ترشح اسید کاهش نشان می‌دهد (۱۸). در مدل حیوانی، درمان حذف عفونت هلیکوباکترپیلوری باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های ECL و مهار هایپرپلازی، دیس پلازی و نئوپلازی در این سلول‌ها می‌شود. در واقع، حذف عفونت هلیکوباکترپیلوری در معده از ایجاد کارسینوئید جلوگیری می‌کند (۱۹).

روند ایجاد سرطان معده در مدل حیوانی و همین‌طور در انسان، روندی طولانی است. در مدل‌های حیوانی، عفونت طولانی مدت با هلیکوباکترپیلوری (۴۰ هفته و بیشتر) تغییرات سرطانی و پیش سرطانی را در سلول‌های معده نشان می‌دهد (۸). مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که عفونت هلیکوباکترپیلوری در میان مدت (۲۰ هفته) و قبل از ایجاد تغییرات سرطانی و پیش سرطانی، باعث افزایش تعداد سلول‌های ECL در معده‌ی موش صحرایی می‌شود.

آئینی و همکاران نشان دادند که کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در معده‌ی موش صحرایی، موجب تغییرات تخریبی و پیش سرطانی اپی‌تلیوم مخاط معده، تخریب سلول‌های پاریتال و مرگ آپوپتوزی این سلول‌ها می‌شود (۱۱). ناکارایی سلول‌های پاریتال معده در تولید اسید، با یک مکانیسم جبرانی هایپرگاسترینمی را به دنبال دارد و گاسترین نیز به دلیل دارا بودن خاصیت تروفیکی در القای هیپرپلازی سلول‌های ECL و در نهایت، تومور نوروآندوکرین مؤثر است. به این ترتیب، ارتباط عملکردی بین سلول‌های پاریتال، سلول‌های ECL و به ویژه سلول‌های مولد گاسترین وجود دارد (۲۳-۲۲).

با توجه به این که گاسترین نقش مهمی در ایجاد تومورهای کارسینوئیدی دارد، در این مطالعه نشان داده شد که کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در معده‌ی موش صحرایی در میان مدت باعث افزایش تعداد سلول‌های مولد گاسترین در لایه‌ی اپی‌تلیالی می‌شود ($P < ۰/۰۰۱$).

Sokic-Milutinovic و همکاران در بیمارانی با مشکلات معده که عفونت هلیکوباکترپیلوری داشتند، نشان دادند که سطح گاسترین سرم آن‌ها و تعداد سلول‌های G معده بیشتر از بیماران بدون عفونت هلیکوباکترپیلوری بود ($P < ۰/۰۵۰$). پس از درمان ریشه‌کنی عفونت هلیکوباکترپیلوری در این بیماران، تعداد سلول‌های G معده و سطح گاسترین سرم به شکل معنی‌داری نسبت به قبل از درمان کاهش نشان می‌دهد (۲۴).

Liu و همکاران نشان دادند که در بیماران مبتلا به گاستریت و عفونت هلیکوباکترپیلوری، تعداد سلول‌های G نسبت به بیماران مبتلا به گاستریت بدون عفونت هلیکوباکترپیلوری و افرادی که هیستوپاتولوژی مخاط معده‌ی طبیعی داشتند، افزایش نشان می‌دهد. همچنین درصد سلول‌های G در کل سلول‌های اندوکرین معده در بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری نسبت به دو گروه دیگر، بیشتر بود (۲۵).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تعداد سلول‌های G در بافت معده‌ی موش‌های صحرایی آلوده به هلیکوباکترپیلوری نسبت به موش‌های بدون عفونت هلیکوباکترپیلوری، افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین در موش‌های مبتلا

به عفونت هلیکوباکترپیلوری، نسبت سلول‌های G به کل سلول‌های ECL ۵۷/۴۴ درصد بود؛ در حالی که این نسبت در گروه موش‌های بدون عفونت ۴۲/۵۶ درصد بود ($P < ۰/۰۰۱$). نتایج مطالعه‌ی حاضر و دو مطالعه‌ی پیش‌گفته، این موضوع را تأیید می‌کند که در نمونه‌های انسانی و حیوانی، عفونت هلیکوباکترپیلوری باعث افزایش تعداد سلول‌های G در بافت معده می‌شود و نکته‌ای که مطالعه‌ی حاضر به آن اشاره می‌کند، این است که عفونت میان مدت هلیکوباکترپیلوری در معده‌ی موش صحرایی موجب افزایش سلول‌های G می‌شود و سایر مطالعات، اثر میان مدت عفونت مورد بررسی قرار نگرفته است.

Cao و همکاران نشان دادند که در مدل حیوانی عفونت هلیکوباکترپیلوری، سطح گاسترین سرم افزایش نشان می‌دهد که این افزایش با ایجاد هایپرپلازی، دیس پلازی و کارسینوئید سلول‌های ECL در معده ارتباط معنی‌دار نشان می‌دهد. پس از درمان ریشه‌کنی هلیکوباکترپیلوری در مدل حیوانی، سطح گاسترین سرم کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد (۱۹).

Zhao و همکاران نقش گاسترین در پاسخ سلول‌های ECL و پاریتال معده به عفونت هلیکوباکترپیلوری در موش C۵۷BL/۶J را بررسی کردند. آن‌ها موش‌ها را دو گروه قرار دادند و در یک گروه، ژن گاسترین تخریب شد ($Gastrin^{-/-}$) و در گروه دیگر ژن گاسترین به صورت طبیعی ($Gastrin^{+/+}$) وجود داشت. سپس به موش‌ها مدت ۹ ماه هلیکوباکترپیلوری گاواژ شد. پس از این مدت، در موش‌های طبیعی دارای ژن طبیعی گاسترین با عفونت هلیکوباکترپیلوری، میزان اسید و درصد سلول‌های پاریتال ترشحی نسبت به موش‌های بدون عفونت کاهش نشان داد. همچنین موش‌های با عفونت هلیکوباکترپیلوری، هیپرگاسترینمی داشتند و سلول‌های ECL دچار هیپرتروفی و هیپرپلازی شدند. در موش‌های تخریب ژن شده‌ی گاسترین، که عفونت هلیکوباکترپیلوری داشتند، میزان اسید ۳ برابر موش‌های مشابه بدون عفونت بود و تعداد سلول‌های پاریتال و ECL معده در موش‌های با ژن تخریب شده‌ی گاسترین با عفونت هلیکوباکترپیلوری تغییری نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اثر عفونت هلیکوباکترپیلوری بر تعداد سلول‌های ECL و پاریتال به واسطه‌ی ژن گاسترین و محصول آن در معده صورت می‌گیرد (۱۸).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان می‌دهد که در عفونت میان مدت هلیکوباکترپیلوری در معده، تعداد سلول‌های مولد گاسترین افزایش می‌یابد که می‌تواند به دنبال آن گاسترینمی را به دنبال داشته باشد؛ این افزایش گاسترین باعث تکثیر سلول‌های ECL و تغییرات آن‌ها می‌شود.

در مجموع، این مطالعه نشان داد که تعداد سلول‌های ECL و G معده در هفته‌ی ۲۰ پس از گاواژ هلیکوباکترپیلوری که دوره‌ی پیش سرطانی سلول‌های معده است، افزایش نشان می‌دهد. این یافته می‌تواند نقش سلول‌های ECL و G در روند ایجاد سرطان معده را آشکار نماید.

در پایان پیشنهاد می‌شود که مطالعات بعدی روی شناسایی مکانیسم‌های درگیر در روند تکثیر سلول‌های ECL و G انجام شود و همچنین عوامل مؤثر در روند مهار تکثیر سلول‌های ECL و گاسترین پس از کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در معده مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ۱۴/۳۹۶۰ در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان تصویب و تأمین مالی شد. کار عملی و آزمایش‌ها در مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، گروه‌های علوم تشریح و ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد. پژوهشگران بدین وسیله از ایشان تشکر و قدردانی به عمل می آورند. در نهایت برای مرحوم یوسف مطهری‌نیا کارشناس ارشد میکروب شناسی، که در انجام کار با هلیکوباکترپیلوری و انجام آزمایش‌های تأییدی در این پژوهش همکاری داشتند، طلب آمرزش می‌نماییم.

References

1. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006; 12(3): 354-62.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 69-90.
3. World Health Organization, Deptartment of Injuries and Violence Prevention. Injuries, violence and disabilities biennial report, 2004-2005. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2006.
4. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter pylori infection: a clinical overview. Dig Liver Dis 2008; 40(8): 619-26.
5. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. J Physiol Pharmacol 2009; 60(3): 3-21.
6. Wen S, Moss SF. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. Cancer Lett 2009; 282(1): 1-8.
7. Khedmat H, Karbasi-Afshar R, Agah S, Taheri S. Helicobacter pylori Infection in the general population: A Middle Eastern perspective. Caspian J Intern Med 2013; 4(4): 745-53.
8. Wroblewski LE, Peek RM, Jr. Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis: mechanisms. Gastroenterol Clin North Am 2013; 42(2): 285-98.
9. Hasegawa C, Ihara T, Sugamata M. Ultrastructural evaluation of apoptosis induced by Helicobacter pylori infection in human gastric mucosa: novel remarks on lamina propria mucosae. Med Electron Microsc 2000; 33(2): 82-8.
10. Neu B, Randlkofer P, Neuhofer M, Voland P, Mayerhofer A, Gerhard M, et al. Helicobacter pylori induces apoptosis of rat gastric parietal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002; 283(2): G309-G318.
11. Aeini F, Rezaie MJ, Motaharinia Y, Rezaee MA. The effect of helicobacter pylori colonization on parietal cells alteration in rat stomach. Armaghane-danesh 2012; 17(2): 102-10. [In Persian].
12. Christopoulos C, Papavassiliou E. Gastric neuroendocrine tumors: Biology and management. Ann Gastroenterol 2005; 18(2): 127-40.
13. Koh TJ, Chen D. Gastrin as a growth factor in the gastrointestinal tract. Regul Pept 2000; 93(1-3): 37-44.
14. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. Carcinoid tumors of the stomach. Surg Oncol 2003; 12(2): 153-72.
15. Modlin IM, Lawton GP, Miu K, Kidd M, Luque EA, Sandor A, et al. Pathophysiology of the fundic enterochromaffin-like (ECL) cell and gastric carcinoid tumours. Ann R Coll Surg Engl 1996; 78(2): 133-8.
16. Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors. World J Gastroenterol 2009; 15(1): 1-16.
17. Bektas M, Sarac N, Cetinkaya H, Toruner M, Erdemli E, Keskin O, et al. Effects of infection and long-term proton pump inhibitor use on enterochromaffin-like cells. Ann Gastroenterol 2012; 25(2): 123-7.
18. Zhao CM, Wang X, Friis-Hansen L, Waldum HL, Halgunset J, Wadstrom T, et al. Chronic Helicobacter pylori infection results in gastric hypoacidity and hypergastrinemia in wild-type mice but vagally induced hypersecretion in gastrin-deficient mice. Regul Pept 2003; 115(3): 161-70.
19. Cao L, Mizoshita T, Tsukamoto T, Takenaka Y, Toyoda T, Cao X, et al. Development of carcinoid tumors of the glandular stomach and effects of eradication in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. Asian Pac J Cancer Prev 2008; 9(1): 25-30.
20. Hu PJ, Yu J, Zeng ZR, Leung WK, Lin HL, Tang BD, et al. Chemoprevention of gastric

cancer by celecoxib in rats. Gut 2004; 53(2): 195-200.
21. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone; 2002. p. 350-1, 729-49.
22. Zhao CM, Chen D. The ECL cell: relay station for gastric integrity. Curr Med Chem 2012; 19(1): 98-108.
23. Chandra SA, Nolan MW, Malarkey DE. Chemical carcinogenesis of the gastrointestinal tract in rodents: an overview with emphasis on NTP carcinogenesis bioassays. Toxicol Pathol 2010; 38(1): 188-97.
24. Sokic-Milutinovic A, Todorovic V, Milosavljevic T, Micev M, Drndarevic N, Mitrovic O. Gastrin and antral G cells in course of Helicobacter pylori eradication: six months follow up study. World J Gastroenterol 2005; 11(27): 4140-7.
25. Liu Y, Vosmaer GD, Tytgat GN, Xiao SD, Ten Kate FJ. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: Helicobacter pylori associated and non-associated gastritis. J Clin Pathol 2005; 58(9): 927-31.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.04.2014
Vol. 32, No. 296, 1st Week, October 2014
Accepted: 26.08.2014

The Effect of Helicobacter Pylori Colonization on Enterochromaffin-Like (ECL) Cell and Gastrin (G) Positive Cells in Rat Stomach

Mohammad Ali Rezaee MSc[1], Mohammad Jafar Rezaie PhD[2], Mohammad Reza Rahmani PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Enterochromaffin-like (ECL) cells have an important role in the gastric tissues. Helicobacter pylori (H. pylori) colonization has effect on function and the number of these cells. The aim of this study was to investigate the effect of 20-weeks Helicobacter pylori colonization on ECL and gastrin (G) positive cells in rat gastric tissues.

Methods: 10 rats were divided equally in two experimental and control groups. Then, Helicobacter pylori or phosphate buffered saline (PBS) were gavaged to experimental and control groups three times a week for 20 weeks, respectively. Bacterial colonization and histopathological features of gastric tissues were examined with hematoxylin-eosin and Giemsa stains. ECL and G cells were investigated in gastric tissues with silver staining and immunohistochemistry (IHC) methods.

Findings: After 20 weeks of gavage, Helicobacter pylori colonization was seen in the gastric tissues. Histopathological changes including epithelial disorganization, epithelial vacuolization, lamina propria and epithelium irregularities in the experimental group were seen. Silver staining showed that the mean number of ECL cells was 11.76 ± 1.79 and 8.35 ± 1.34 cells/volume unit in experimental and control groups, respectively ($P < 0.001$). Immunohistochemistry staining showed that mean number of G cells was 6.74 ± 1.21 and 3.65 ± 0.08 cells/volume unit in experimental and control groups, respectively ($P < 0.001$).

Conclusion: This study showed that colonization of Helicobacter pylori induces epithelial disorganization and vacuolization, lamina propria and epithelium irregularities in gastric tissues and also increases the number of ECL and G cells in these tissues.

Keywords: Helicobacter pylori, Enterochromaffin-like (ECL) cells, Gastrin producing (G) cell, Immunohistochemistry (IHC)

Citation: Rezaee MA, Rezaie MJ, Rahmani MR. **The Effect of Helicobacter Pylori Colonization on Enterochromaffin-Like (ECL) Cell and Gastrin (G) Positive Cells in Rat Stomach.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(296): 1238-49

1- Instructor, Department of Immunology and Hematology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Immunology and Hematology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Corresponding Author: Mohammad Jafar Rezaie PhD, Email: rezaiemjafar@gmail.com