مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره اول (پیاپی ۲۶) بهار ۱۳۹۵
صفحات ۷۵-۷۱

Short Communication

بررسی قابلیت چسبندگی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* به رده سلولی HEp-2

زینب تکلو*[۱]، مهدی گودرزوند[۲]، زهره خدایی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، [۲] استادیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، گروه فیزیولوژی، [۳] استادیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، گروه بیوشیمی، ژنتیک و تغذیه.

چکیده

اولین قدم برای انتخاب یک سویه پروبیوتیک، تعیین قابلیت چسبندگی آن سویه به مخاط میزبان است تا علاوه بر پیشگیری از چسبندگی باکتری های بیماری زا، با ترشح ترکیبات ضد میکروبی، شرایط نامناسب برای رشد آنها فراهم گردد. این مطالعه با هدف ارزیابی قابلیت چسبندگی سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* به رده سلولی HEp-2 انجام شد. در ابتدا لایه سلولی به پلیت ٦ چاهکی منتقل و در محیط کشت RPMI حاوی سرم جنین گوساله و آنتی بیوتیک رشد داده شد. سپس باکتری پروبیوتیک کشت شده در محیط MRS براث، به میزان مشخص به رده سلولی اضافه شد. پس از تعیین زمان مطلوب برای تماس باکتری با لایه سلولی، شستشو انجام شد. سپس سلول ها رنگ آمیزی و با روش های بافت شناسی تثبیت شدند. قابلیت یا عدم قابلیت و طرح چسبندگی باکتری پروبیوتیکی در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. نتایج نشان داد که زمان ۳ ساعت زمان مناسب برای آزمون است و *لاکتوباسیلوس کازئی* قابلیت چسبندگی به سلول مخاط دهانی- حلقی را دارا می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* به عنوان پروبیوتیک در محصولات بهداشتی مربوط به دهان و دندان پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، چسبندگی، رده سلولی HEp-2 ، *لاکتوباسیلوس کازئی*.

دریافت مقاله: مهرماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹٤

مقدمه

پروبیوتیک ها گروهی از میکروارگانیسم های زنده هستند که در صورت افزوده شدن به مواد غذایی و یا مصرف آنها به شکل مکمل، می توانند با ایجاد یک تعادل بیولوژیک در بدن، موجب بهبود سلامت میزبان گردند (۱). باکتری های *لاکتوباسیلوس* (*Lactobacilus*) و *بیفیدوباکتریوم* (*Bifidobacterium*) از متداول ترین باکتری های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک می باشند. مهم ترین فواید پروبیوتیک ها، داشتن فعالیت تخمیری، رشد و ماندگاری مناسب در محصولات غذایی، مقاومت در برابر فاژها، تنظیم فلور نرمال حفره های دهانی و روده و مهار باکتری های بیماری زا و مضر است (۲).

از عوامل موثر برای تشخیص یک باکتری پروبیوتیک می توان به غیر بیماریزایی، عدم ارتباط با باکتری های مولد اسهال، توانایی در حفظ پایداری ژنتیکی و عدم توانایی در انتقال ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و قابلیت چسبندگی (که اولین مرحله در استقرار است) اشاره نمود (۳).

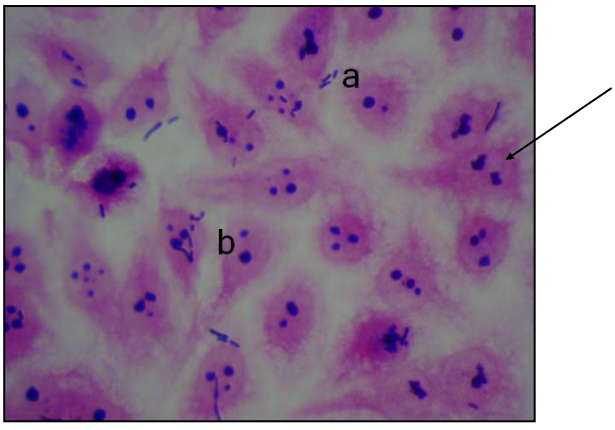
اولین قدم برای انتخاب یک سویه به عنوان پروبیوتیک تعیین قابلیت چسبندگی آن سویه به مخاط میزبان می باشد تا علاوه بر پیشگیری از چسبندگی باکتری های بیماری زا، با ترشح برخی مواد بتواند محیط را نیز برای رشد آنها نامساعد سازد. قابلیت چسبندگی باکتری به جلوگیری از چسبیدن عامل بیماری زا، ترمیم موکوس صدمه دیده و طولانی کردن استقرار توسط باکتری کمک می کند (٤). همچنین باعث ماندگاری باکتری در دهان و مانع چسبندگی باکتری های مولد پوسیدگی و بوی بد دهان می شود (۵). برای بررسی چسبندگی در محیط آزمایشگاهی می توان از موکوس یا لایه سلولی متناسب با اندام

* آدرس برای مکاتبه: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۲۲٤۱۲٤٤ پست الکترونیک: takalloo_h@yahoo.com

هدف استفاده نمود. برای مطالعات مربوط به بهداشت دهان و دندان بهتر است از لایه سلولی با منشا دهانی–حلقی استفاده شود. رده سلولی HEp-2 بر گرفته از کارسینومای مخاط حلق است که اغلب به منظور بررسی قابلیت چسبندگی باکتری های *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) از آن استفاده می شود (٦ و ٧). هدف از این مطالعه ارزیابی قابلیت چسبندگی سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacilus casei*) به رده سلولی HEp-2 بود.

مواد و روش ها

رده سلولی HEp-2 در محیط کشت RPMI (Bio idea، ایران) حاوی سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum= FBS) یا سرم جنین گوساله (Fetal calf serum) (Bio idea، ایران) و آنتی بیوتیک رشد داده شد. سلول ها در حالی که بر روی لامل های شیشه ای (کاوراسلیپ ها) و کف چاهک چسبیده بودند، با PBS شستشو داده شدند. محیط کشت (RPMI+FBS) جدید بدون آنتی بیوتیک آماده گردید. پس از تعیین زمان مطلوب برای آزمایش، باکتری پروبیوتیکی کشت داده شده در محیط MRS براث (کشت پروبیوتیک) (مرک، آلمان) به هپتوسل اضافه شد. برای مشاهده چسبندگی یا عدم چسبندگی، لایه سلولی قرار گرفته بر روی کاور اسلیپ با استفاده از روش های بافت شناسی، میکروب شناسی و به کمک متانول تثبیت و رنگ آمیزی (رنگ گرم) گردید. پس از دهیدراتاسیون، لامل ها درون استن غوطه ور و با زایلین (گزیلن) سلول ها شفاف سازی شدند. لامل ها با چسب سلول (هیستومانت) بر روی لام چسبانده شد و سپس در زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند. در این روش نه تنها سلول ها رنگ آمیزی شدند بلکه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از هم متمایز شدند. باکتری گرم مثبت به رنگ بنفش و باکتری گرم منفی به رنگ قرمز دیده شدند.



شکل ۱: بررسی قابلیت و طرح چسبندگی *لاکتوباسیلوس کازئی*. پیکان مشخص کننده سلول هپتو می باشد. a) دسته ۳ تایی باکتری پروبوتیک چسبیده به لبه سلول، b) دسته ۳ تایی باکتری پروبوتیک چسبیده به سطح سلول. بزرگنمایی ۱۰۰۰×

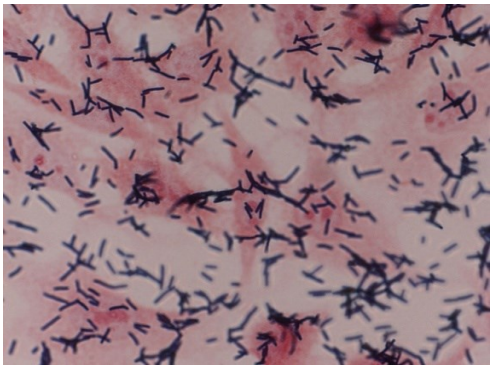
قابلیت یا عدم قابلیت و طرح چسبندگی باکتری پروبیوتیک در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. از پروبیوتیک های با طرح چسبندگی شناخته شده مانند *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacilus acidophilus*) (بدون قابلیت چسبندگی) به عنوان کنترل منفی و باکتری *اشریشیا کلی* (با قابلیت چسبندگی) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (٧).

یافته ها

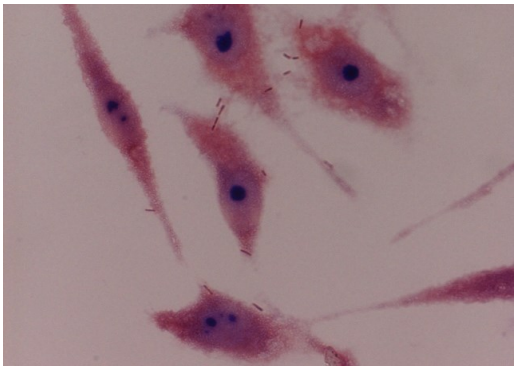
در این مطالعه، *لاکتوباسیلوس کازئی* به لایه سلولی اضافه شد. پس از قرار دادن باکتری بر روی سلول HEp-2 تعداد و نحوه چسبندگی باکتری بر لایه سلولی مشاهده گردید. نتایج نشان داد که باکتری به صورت پراکنده و در دستجات ۲ یا ۳ تایی به لبه سلول و یا سطح سلول چسبیده است (شکل ۱). نتایج نشان داد که زمان ۳ ساعت مناسب ترین زمان برای آزمون است و *لاکتوباسیلوس کازئی* قابلیت چسبندگی به سلول مخاط دهانی–حلقی را دارا می باشد. گرماگذاری طولانی تر باعث چسبندگی بیشتر باکتری ها می شود. اما با افزایش زمان گرماگذاری بیش از ۳ ساعت، چسبندگی غیر اختصاصی باکتری بر روی لامل شیشه ای را به دنبال داشت (شکل ۲ و ۳).

بحث

در سال های اخیر استفاده از سویه های مختلف باکتری های پروبیوتیک برای بهداشت دهان مورد توجه قرار گرفته است. محققان درصدد یافتن سویه هایی با خواص جلوگیری کننده از



شکل ۲: بررسی میزان چسبندگی باکتری به لایه سلولی. زمان بیش از ۳ ساعت، تعداد باکتری های بیشتری به شیشه می چسبد.



شکل۳: انکوباسیون *لاکتوباسیلوس* روی سلول های هپتو در زمان یک ساعت، در دمای ۳۷ °C و پنج درصد Co_2.

پوسیدگی دندان و قابلیت استقرار در محوطه های دهان و اطراف دندان ها به منظور جلوگیری از فعالیت میکروب های بیماری زا می باشند.

قابلیت چسبندگی سویه های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به سطح حفره دهانی در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است (۷). رده سلولی HEp-2 ، بر گرفته از کارسینومای مخاط حلق است که برای بررسی چسبندگی باکتری های پروبیوتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (٦). با توجه به شباهت مخاط دهان و حلق استفاده از این لایه سلولی برای بررسی قابلیت چسبندگی پروبیوتیک مناسب به نظر می رسد. از سلول های HEp-2 برای چسبندگی اپی تلیال *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* استفاده می شود. زیرا این لایه سلولی به سرعت در حال رشد است و یک مدل مفید برای چسبندگی می باشد (۸).

پژوهش های مشابه با مطالعه حاضر بر روی سلول های $Caco_2$ و HEp-2 در زمان های انکوباسیون مختلف انجام شده است. جاکوبسن (Jacobsen) و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۱۰) تاثیر مدت زمان یک ساعت، تومولا (Tuomola) و سالمینن (Salminen) در سال ۱۹۹۸ (۹) تاثیر مدت زمان یک و نیم ساعت و یا بودا (Boudeau) در سال ۲۰۰۳ (۱۱) اثر مدت زمان بالای ٤ ساعت را بر روی اتصال باکتری به سلول های $Caco_2$ و HEp-2 مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های مطالعه حاضر نشان داد که زمان بهینه برای گرماگذاری ۳ ساعت می باشد.

برای بررسی خاصیت چسبندگی از روش های متفاوتی استفاده شده است. به عنوان مثال هوکیوجا (Haukioja) و همکاران در سال ۲۰۰٦ از پوشش هیدروکسی آپاتیت بر روی پلیت استفاده نمودند و باکتری های با قابلیت چسبندگی به این لایه را دارای پتانسیل استفاده در بهداشت دهان دانستند (۱۲). از روش های دیگر سنجش چسبندگی می توان به الایزا، میکروسکوپ نوری و شمارش پلیت اشاره نمود. در این مطالعه برای بررسی چسبندگی یا عدم چسبندگی و همچنین طرح چسبندگی، با توجه به در دسترس بودن امکانات و عدم احتیاج به تکنولوژی پیشرفته و ایمنی بالا از روش رنگ آمیزی بافت و میکروسکوب نوری استفاده گردید. مطالعه حاضر در محیط کنترل شده آزمایشگاه و بر روی لایه سلولی انجام گردید. پیشنهاد می گردد که برای تعمیم نتایج آزمون های مکرری بر روی حیوان آزمایشگاهی و نمونه انسانی انجام شود.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* برای استفاده در محصولات بهداشتی مربوط به دهان و دندان مورد آزمایش قرار گرفت. این پژوهش نشان داد که این باکتری قابلیت چسبندگی به لایه سلولی هپتو (اپی تلیال دهانی–حلقی) را دارا می باشد. با توجه تاثیرات ضد بیماری زایی این باکتری، استفاده از آن به عنوان دهان شویه یا خمیر دندان پروبیوتیک پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر آذر سبکبار به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. Oral Dis. 2007; 13(5): 443-451.

2. Vanderpool C, Yan F, Polk D B. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. 2008; 1(4): 1585-1596.

3. Bonifait L, Chandad F, Grenier D. Probiotics for oral health: myth or reality? J Can Dent Assoc. 2009; 75(8): 585-590.

4. Twetman S, Stecksen-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. Int J Paediatr Dent. 2008; 18(1): 3-10.

5. Saha S, Tomaro- Duchesneau C,Tabrizian M, Prakash S. Probiotics as oral health biotherapeutics. 2012; 12(9): 1207-1220.

6. Hatakka K, Ahola AJ, Yli H, Richardson M. Probiotics reduce the prevalence of oral Candida in the elderly– a randomized controlled trial. J Dent Res. 2007; 8(6):125-130.

7. Haeri A, Khodaii Z, Ghaderian SMH. Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, Hep-2 and T84 cell lines. Ann Microbiol. 2012; 62(1): 339-344.

8. Kodama Y, Sasaki M, Shimoyama Y, Tajika S, Kimura S. Adhesion mechanism of *Streptococcus anginosus* to mucosal epithelial cells. Clin Microbiol Vienna, Austria. 2010; 4(3): 10-13.

9. Tuomola, EM , Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. Int J Food Microbiol. 1998; 41(1): 45-51.

10. Jacobsen CN. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(11): 4949-4959.

11. Boudeau J. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 18(1): 45-56.

12. Haukioja A, Yli –Knuuttila H, Liomaranta V. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Oral Micorbiol Immunol. 2006; 2(1): 326-332.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 1, April 2016

Short Communication

Evaluation of adherence of probiotic *Lactobacilus casei* to Hep2– cell line

Zeinab Takalloo[1], Mahdi Goudarzvand[2], Zohreh Khodaii[3]

[1]MS.c., Department of Biology, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine , Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biochemistry, Genetics and Nutrition, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

Abstract

The first step to choose a strain as probiotic is capability for the bacteria to adhere to mucosal adhesion due to increase the prevention of the adherence of pathogenic bacteria, and the secretion of antimicrobial agents, which produce an appropriate condition of microbial growth. This study was aimed to evaluate the adherence ability of *Lactobacilus casei* to Hep-2 cell line. First, the HEp-2 cells were grown in RPMI medium containing fetal calf serum and antibiotics. The defined numbers of probiotic bacteria grown in MRS broth were added to the HEp-2 cell. Then, the cells were washed after attachment of bacteria to the plates. Thereafter, the cells were stained and fixed with histological methods. The adhesion ability of bacteria and the pattern of adhesion was observed under optical microscope. Our results showed that *L. casei* was able to adhere to oro-pharyngeal cell line. Also, the optimum time to test the ability was 3 hours. These results indicated that the probiotic bacterium *L. casei* is suitable for application in health products. Based on these results, we recommend application of *L. casei* in oral hygiene products.

Keywords: Probiotics, Adhesion, HEp-2 cells, *Lactobacillus casei*.

Correspondence to: Zeinab Takalloo

Tel: +98 9122241244

E-mail: takalloo_h@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(1): 71-75.