معرفی سلول HepII جهت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری

ناهید رحیمی‌فرد Ph.D.☆★♦، اکبر میرصالحیان Ph.D.☆، پرویز مالک‌نژاد Ph.D.☆، ناصر ابراهیمی دریانی Ph.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه میکروبشناسی

★ وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، اداره کل آزمایشگاهی کنترل، گروه میکروب‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان امام خمینی

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۴۷، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه میکروبشناسی

چکیده

* **هدف:** ارائه سلول مناسب برای چسبندگی هلیکوباکترپیلوری و روش مناسب برای بررسی چسبندگی هلیکوباکترپیلوری به سلولها در شرایط آزمایشگاه

* **مواد و روشها:** ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری از بیوپسی انتر معده یا دوازدهه ۴۹ بیمار با علائم دیس پپسی، گاستریت، زخم معده، زخم اثنی عشر و... جدا شد، با استفاده از فعالیت اوره آزی هلیکوباکترپیلوری UPR (Urea Phenol Red) چسبندگی به هفت رده سلول انسانی از طریق روش ELISA بررسی شد. با مقایسه روشهای گزارش شده، ادغام و یا تغییر در آنها از نظر نوع سلول، غلظت شیرابه سلولی و باکتری، دما و مدت زمان تماس مجاورت باکتری و سلول روش مناسب و بهترین سلول برای مقایسه چسبیدن هلیکوباکتر به سلولها بدست آمد.

* **یافته‌ها:** هلیکوباکترپیلوری به تمام هفت رده سلولی استفاده شده در in vitro می‌چسبد و چسبندگی به سلولهای به ترتیب از HT29,HT29/219,AGS,SW42,HeLa,HepII تا Caco-2 کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد و بهترین چسبندگی به سه رده سلول اول بود. استفاده از غلظت شیرابه میکروبی معادل لوله ۱ مک فارلند برای هلیکوباکترپیلوری و شیرابه سلولی حاوی ۵×۱۰^{۴} سلول در میلی لیتر، زمان ۹۰ دقیقه مجاورت باکتری با سلول در ۳۷ درجه سانتیگراد منجر به حداکثر چسبندگی شد. بین ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری از نظر چسبیدن به سلولهای تفاوت معنی داری وجود نداشت.

* **نتیجه‌گیری:** برای بررسیهای چسبندگی (Attachment)، ممانعت از چسبندگی (inhibition of attachment) جداسازی (Detachment) استفاده از روش چسبندگی ارائه شده در این تحقیق توصیه می‌شود و از بین هفت رده سلول آزمایش شده، سلول HepII بعنوان سلول مناسب برای استفاده در این گونه تحقیقات پیشنهاد می‌گردد.

گل واژگان: هلیکوباکتر پیلوری، سلول HepII، UPR، ELISA، چسبندگی

مقدمه

پس از اولین مشاهدات باکتریهای اسپریل شکل در معده انسان و حیوانات در سال ۱۸۸۱ توسط Rappin و در سالهای بعد مشاهدات، بررسیها و کشت هلیکوباکتر پیلوری توسط دیگر محققین، سرانجام هلیکوباکتر پیلوری در سال ۱۹۸۹ در جنس جدیدی بنام Helicobacter از فامیل Helicobacetraceae و راسته بنام Heilcobacter کلاس Epsilon proteobacteria شاخه Proteobacteria قرار گرفت (۱). با توجه به نقش ثابت شده هلیکوباکتر پیلوری در آدنوکارسینومای معده، تومورهای لنفوییدی مخاط، زخمهای معده و اثنی‌عشر و گاستریت و همچنین کارسینوژن بودن این میکروارگانیسم، درمان و یا پیشگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری مورد توجه واقع شده است (۲، ۳، ۴). از آنجاکه قدم اولیه در ایجاد عفونت، چسبیدن و جایگزینی هلیکوباکتر پیلوری در مخاط معده است (۵، ۶) لذا اخیراً از استراتژیهای درمانی جدید نظیر استفاده از مشتقات شیر یا آغوز، عصاره‌های گیاهی، مواد ضد زخم و غیره جهت ممانعت از چسبندگی این باکتری به مخاط معده استفاده می‌کنند (۵، ۶، ۷). جهت بررسی اثرات ضد چسبندگی این مهارکننده‌ها از خاصیت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری (۸، ۹) به رده‌های سلولی مختلف در آزمایشگاه استفاد می‌شود. چسبیدن هلیکوباکتر پیلوری به رده‌های مختلف سلولی در آزمایشگاه تحت شرایط خاصی صورت می‌پذیرد (۱۰، ۱۱) و یافتن و ارائه این شرایط خاص برای شروع تحقیقات فوق بسیار ارزشمند است. در این بررسی با ارائه روش مناسب جهت چسبندگی، مقایسه چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به هفت رده سلولی Hela,HT29,HT29.219.SW742, AGS,HepII,Caco-2 به روش Urea Phenol Red(UPR) (۷) صورت گرفت و سلولهای فوق از نظر قدرت چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری مقایسه و رده سلولی مناسب تعیین گردید.

مواد و روشها

* باکتریها و شرایط رشد

۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری از بیوپسی ناحیه انتر معده ۴۹ بیمار مراجعه کننده جهت آندوسکوپی جدا شد. ابتدا یک قطعه بیوپسی در یک میلی لیتر محیط تابوگلیکولات حاوی مکمل آنتی بیوتیکی (Freeze Dried supplements, Oxoid) قرار گرفت (حداکثر زمان نگهداری و انتقال نبایستی بیش از ۳ ساعت باشد). یک قطعه دیگر بیوپسی برای تهیه اسمیر مستقیم بین دو لام فشرده و اسمیر تماسی (Impersion smear) تهیه شد و لامها پس از ثبوت با متانول، بروش گیمسا رنگ آمیزی شدند. تست اوره‌از سریع برای قطعه دیگر بیوپسی در اتاق اندوسکوپی انجام شد. قطعات بیوپسی را در هاون چینی استریل کاملاً خرد و سریع در محیط کشت کلمبیا آگار کشت شدند. محیطها در انکوباتور CO2 (10%CO2) با شرایط میکرو آئروفیلیک و یا در جار حاوی گاز پک C(Anaerocult C, Merck) و یک پنبه مرطوب بمدت ۵ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت کلونی‌های هلیکوباکتر پیلوری به اندازه ۱-۲ میلی‌متر محدب با لبه‌های صاف، بدون رنگ روی محیط ظاهر شدند. تستهای تشخیصی اکسیداز، کاتالاز، اوره‌از و حساسیت به سفالکسین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید و رنگ‌آمیزی گرم از کلونی‌ها انجام شد. پس از تائید آزمایشات تشخیصی برای هلیکوباکتر پیلوری باکتریهای بدست آمده، در آزمایش چسبندگی (Attachment) از پاساژ اول تا حداکثر پنجم استفاده شدند و برای نگهداری سرم حاوی ۲۰درصد گلیسرول، خون گوسفند حاوی ۱۰درصد، بروسلا بروث حاوی فتال کالف سرم حاوی ۲۰درصد گلیسرول، ۲۰درصد استفاده شد.

* سوسپانسیون باکتری برای آزمایش Attachment

در روز آزمایش از کشت ۲۴ ساعته هلیکوباکتر پیلوری سوسپانسیونی معادل استانداردهای ۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند در PBS که به ترتیب دارای غلظتهای $۱/۵\times۱۰^{۸}$، ۳×۱۰^{۸}، ۶×۱۰^{۸} cfu/ml بودند، تهیه شد.

* رده‌های سلولی

رده‌های سلولی AGS,HT29/219,HT29,Sw742,HepII,HeLa Caco-2، بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران، در محیط DMEM(sigma) حاوی ۱۰درصد فتال کالف سرم بطور مرتب و مداوم پاساژ و در انکوباتور CO2 با CO2 ۶درصد نگهداری شدند.

* آماده سازی سلولها برای آزمایش Attachment

۴۸ ساعت قبل از آزمایش از هر نوع سلول، پس از تریپسینه‌کردن و تغلیظ، سوسپانسیون سلولی حاوی ۵×۱۰^{۴} cell/ml تهیه شد. شمارش سلولها بدنبال مخلوط ساختن آنها با رنگ‌آمیزی کرزیل بلو ۱درصد بطور هم حجم و توسط لام نئوبار صورت گرفت. سپس برای تشکیل منولایر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در چاهکهای میکروپلیت Flat-bottom96-well micro Titer plate(Biomat) ریخته و تا زمان آزمایش (حداقل) ۴۸ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت بعد) در انکوباتور CO2(CO26%) نگهداری شدند.

* آزمایش چسبندگی (Attachment assay)

در روز آزمایش میکروپلیتهای حاوی منولایر سلولی سه بار با PBS شستشو شده و با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ۲۴ ساعته هلیکوباکتر پیلوری با غلظتهای ۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند مجاور گردید، سپس به چند روش ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در دمای محیط با حرکت روی روتاتور و ۱۵، ۳۰ و ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد (انکوباتور CO2) گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت چاهکها سه بار با محلول شستشوی سرم فیزیولوژی حاوی ۰/۰۳درصد فنول رد برای حذف باکتریهایی که به سلولها در کف میکروپلیت نچسبیده‌اند، شسته شده و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۲درصد اوره و ۰/۰۳درصد فنل در اضافه و پس از زمانهای ۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه و ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه در

انکوباتور CO2 دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، توسط دستگاه الایزا ریدر Anthos ۲۰۲۰ در طول موج ۵۵۰ نانومتر میزان جذب نوری (OD) هر چاهک خوانده شد. کنترل مثبت، چاهکهای حاوی سوسپانسیون باکتری و کنترل منفی، چاهک‌های حاوی فقط سلول بوده که سوسپانسیون باکتری به آنها اضافه نشده بود. ضمناً آزمایش بصورت حداقل دوتایی برای هر سوش باکتری با هر نوع سلول انجام شد.

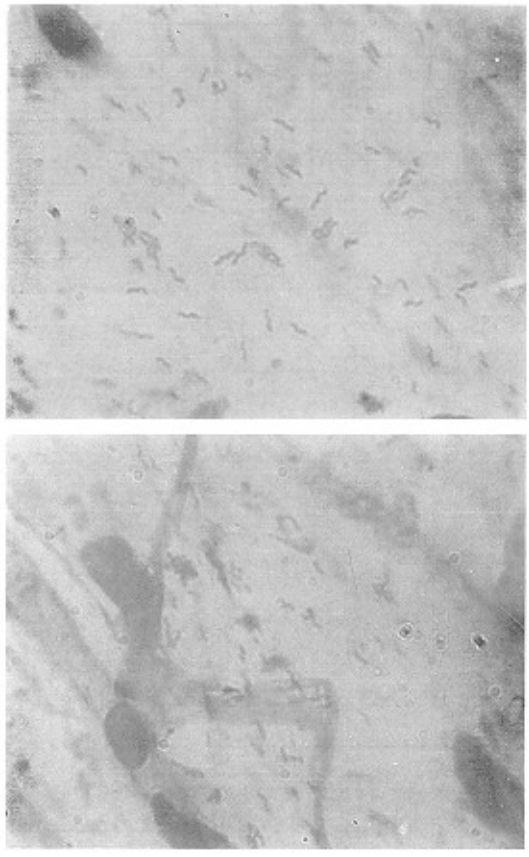
درصد چسبندگی از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد چسبندگی} = \frac{OD_{test} - OD_{negative}}{OD_{positive}} \times ۱۰۰$$

یافته‌ها

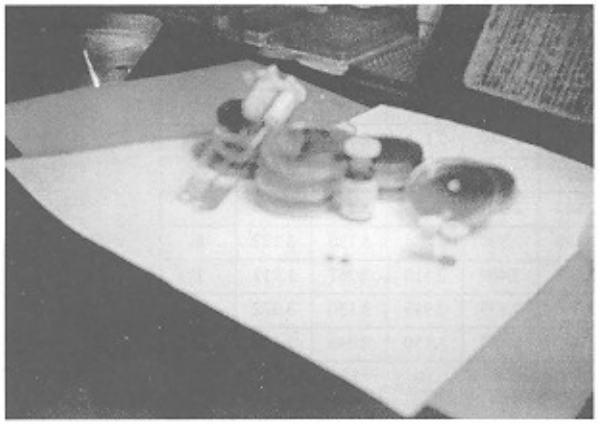
در اسمیرهای تماسی مربوط به بیماران آلوده با رنگ‌آمیزی گیمسا سلولهای اپی‌تلیال معده و تجمعی از هلیکوباکترهای خمیده دیده شد (تصاویر ۱a و ۱b).

آزمایشهای اوره از سریع در اتاق اندوسکوپی برای ۴۹ بیمار انجام شد که ۲۵ تست (۵۱درصد) مثبت شد (تصویر ۲).

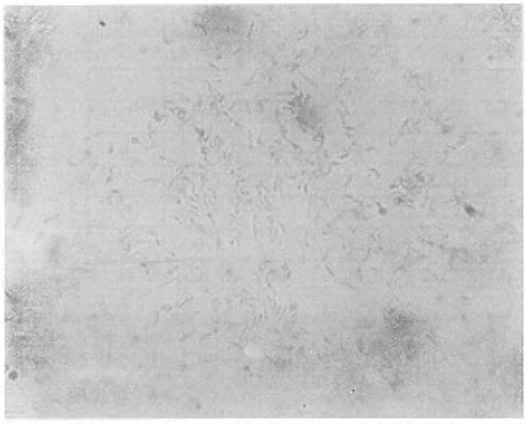


تصاویر ۱a و ۱b: هلیکوباکترپیلوری در اسمیر تماسی از بیوپسی معده، رنگ‌آمیزی گیمسا (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)

از ۴۹کشت انجام شده ۲۲کشت (۴۴/۸۹درصد) از نظر هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودکه دارای واکنشهای اوره از نظر اکسیداز، کاتالاز مثبت و مقاوم به نالیدیکسیک اسید و حساس به سفالکسین بودند. و در رنگ‌آمیزی گرم از کلونی‌ها اسپریل‌های خمیده گرم منفی مشاهده شد (تصویر ۳).



تصویر ۲: تستهای تشخیصی هلیکوباکترپیلوری، اوره از ردیف، اکسیداز، اوره از، حساسیت به سفالکسین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)



تصویر ۳: هلیکوباکتر پیلوری در اسمیر از کلنی، رنگ‌آمیزی گرم (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)

در آزمایش چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به رده‌های سلولی بهترین چسبندگی با سوسپانسیون باکتریایی معادل ۱ مک‌فارلند بدست آمد. تمام ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری به ۷ رده سلولی مورد مطالعه چسبندگی را در عرض ۵ تا ۱۰ دقیقه نشان دادند (تصاویر ۴ و ۵) و در عرض ۲ ساعت اشباع شدند. توزیع میزان چسبندگی بین ۷ رده سلولی با استفاده از آزمون K.Smirnov نرمال بود.

بین ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری از نظر چسبندگی پس از انجام آنالیز واریانس $P<0.05$ اختلاف معنی داری وجود نداشت، ولی در میزان چسبندگی به ۷ رده سلولی با انجام آنالیز واریانس $P<0.05$ اختلاف معنی داری مشاهده شد. شرایط و زمان مجاور سازی باکتریها با سلولها در میزان چسبندگی نقش داشته و برای تفریق و ارزیابی چسبندگی شرایط و زمان مناسب در بین روشهای آزمایش شده در زمان ۹۰ دقیقه بیشترین چسبندگی مشاهده شد (جداول ۱ و ۲). در دمای آزمایشگاه و زمانهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه چسبندگی انجام شد ولی میزان آن پایین‌تر از شرایط فوق بود.

جدول ۱: بررسی چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری به سلول HepII: زمان تماس ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد ۱۲ سوش به طور چهارتایی از A تا D و از شماره ۱ تا شماره ۱۲ (چهار ردیف بالای جدول)، ۱۱ سوش به طور چهار تایی از E تا H و از شماره ۱ تا ۱۱ (چهار ردیف پایین جدول).

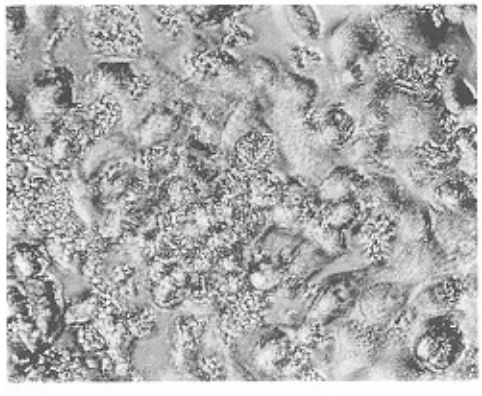
کنترل مثبت: شماره ۱۲ از E تا H

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
3.175	2.532	3.001	2.74	3.336	2.933	2.986	3.341	1.971	1.599	1.743	3.272	A
3.175	2.753	2.690	3.238	3.336	2.970	2.386	3.341	1.749	2.195	2.452	3.272	B
2.815	2.334	3.070	3.238	2.578	1.384	2.923	2.654	2.651	2.661	2.747	2.550	C
3.175	3.261	2.953	3.235	3.336	3.068	2.369	2.843	1.591	2.226	3.130	2.776	D
2.694	2.501	0.632	2.378	3.336	1.974	3.074	2.190	2.939	3.034	3.130	3.122	E
1.886	2.901	2.539	3.238	3.336	2.884	2.366	2.583	2.460	2.510	2.267	1.911	F
3.175	3.151	2.127	1.602	2.964	2.155	3.074	2.850	2.673	2.985	3.130	3.272	G
2.887	1.421	1.256	0.960	3.336	2.726	3.074	2.033	2.639	3.150	2.943	1.119	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	H

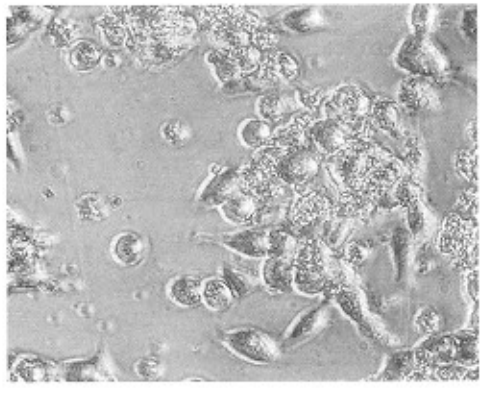
جدول ۲: بررسی چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکترپیلوری به سلول HepII: زمان تماس ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد، ۱۲ سوش به طور چهارتایی از A تا D و از شماره ۱ تا شماره ۱۲ (چهار ردیف بالای جدول)، ۱۱ سوش به طور چهار تایی از E تا H و از شماره ۱ تا ۱۱ (چهار ردیف پایین جدول).

کنترل مثبت: شماره ۱۲ از E تا H

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.940	1.457	1.447	1.834	1.040	1.075	0.776	1.092	1.252	0.615	1.564	1.377	A
B	1.515	1.375	0.828	1.473	1.584	1.077	0.899	1.337	1.176	1.171	1.120	1.073	B
C	1.223	0.901	1.189	0.639	1.072	1.283	1.132	1.261	1.208	1.155	1.365	1.425	C
D	1.308	1.830	1.153	1.323	1.206	1.046	1.004	1.602	0.959	0.804	0.682	1.432	D
E	1.476	1.374	1.679	1.492	1.791	1.105	1.374	1.494	1.219	1.040	1.429	1.232	E
F	1.041	1.428	1.105	0.765	1.025	1.218	0.960	1.191	0.845	1.886	1.464	1.074	F
G	0.798	1.015	0.870	1.509	1.190	1.305	1.573	1.870	1.158	1.031	1.293	0.786	G
H	1.392	1.643	1.372	1.296	1.083	0.955	1.068	0.937	1.503	1.201	1.152	1.343	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	H



تصویر ۴: هلیکوباکترپیلوری چسبیده به سلول‌های کشت (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)



تصویر ۵: هلیکوباکترپیلوری چسبیده به سلول‌های کشت (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)

زمان مناسب در روش UPR برای خواندن با دستگاه الایزا ریدر پس از افزودن محلول سالین فنل رد اوره و نگهداری میکروپلیتها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور CO2 ۴۵ دقیقه بود. روش مناسب برای نگهداری سلولها استفاده از DMSO ۱۰درصد در فنال کالف سرم و برای نگهداری هلیکوباکتر پیلوری گلیسرول ۲۰درصد در فنال کالف سرم‌در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد بود.

بحث

چسبیدن باکتریهای پاتوژن به سلولهای هدف یک قدم مهم در پاتوژنز بسیاری از بیماریهای باکتریایی است (۵، ۶، ۱۲). برای مثال به دنبال چسبیدن ارگانیسم‌ها به سطوح مخاطی دستگاه گوارش بافتهای میزبان در معرض غلظتهای بیشتری از انتروتوکسینهای باکتری قرار می‌گیرند. چسبیدن برای ورود ارگانیسم‌ها به سلولهای اپی‌تلیال نیز مهم است. بررسیهای بافت‌شناسی از نمونه‌های بیوپسی آنتر معده انسان نشان داده‌که هلیکوباکتر پیلوری درون مخاط معده است و به غشاهای apical سلولهای اپی‌تلیال معده چسبیده است. کوتاه شدن میکروویلی‌ها و خرابی فیلامنتهای سیتواسکلتال در نقاطی که باکتری چسبیده مشاهده می‌شوند. از نظر مرفولوژیکی این نواحی چسبندگی در سطح سلول کاملاً مشابه جراحتهایی است که در روده‌های بزرگ و کوچک بعلت عفونت انتروپاتولوژنیک E.coil مشاهده می‌شود.

چسبیدن H.pylori به سلولهای انسانی در vitro In کاملاً مشابه آنچه

در In vivo مشاهده می‌شود است (۱۲).

آدهزینها، پروتئینها، گلیکوکنژوگه‌ها یا لیپیدهای باکتریایی هستند که در مراحل اولیه جایگزینی دخیل اند (۹). هلیکوباکتر پیلوری دارای ادهزینهای زیادی است از جمله HopZ,Nap,Hpa A, Hsp60, 70, Bab A, B, LPS core, LPS A tigen, an LPS پروتئینهای ۶۳، ۶۱، ۲۵، ۶ و ۱۹ کیلو دالتونی و گیرنده‌های سلولی لوئیس b و N استیل نورامینیل لاکتوز (سیالیک اسید)، لاکتوزیل سرامید سولفات، لامینین، لوئیس x موسین، هپاران سولفات و دیگر پلی ساکاریدهای سولفاته، فسفاتیدیل اتانل امین، گانگلیوتری اسپل سرامید، ۱۰۰۰ اینتگرین (۹).

در این تحقیق خصوصیات چسبندگی ۲۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری به ۷ رده سلولی انسانی بررسی شد، در مطالعات زیادی چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری به سلولهای مختلف گزارش شده است از جمله T84: توسط L.C.Theulaz و همکارانش از فرانسه در سال ۱۹۹۶ (۱۰)، Hela و Kato III توسط Guzman-Murillo و همکارانش از مکزیک در سال ۲۰۰۱ (۱۱)، Vero ceels توسط Hatay و همکارانش از ژاپن در سال ۱۹۹۹ (۶)، سلولهای، Caco, HT29, HepII, AGS, Y1, Hu Tu-80 توسط P.M.Simon و همکارانش از آمریکا در سال ۱۹۹۷، Kato III توسط S.G.Hemalatha و همکارانش از کانادا در سال ۱۹۹۱ (۱۲)، AGS توسط R.P.H,Logan و همکارانش در سال ۱۹۹۷ از ژاپن (۱۳) و سولهای پوششی معده توسط S.Hayashi و همکارانش در سال ۱۹۹۸ از ژاپن (۱۴).

در این مطالعات روشهای مجاورت باکتری با سلولها و زمان مجاورت و غلظتهای سوسپانسیون میکروبی متفاوت بوده است با ادغام آنها و کمی تغییر در بعضی مراحل ما توانستیم به یک روش مناسب جهت چسبندگی دست یابیم. در اکثر این مطالعات چسبندگی به یک یا دو سلول بررسی شده بود و تنها مطالعه‌ای که ۶ رده سلولی را بررسی کرده (۷) مطالعه آقای دکتر سیمون است که پس از مقایسه سلولهای HepII و HuTu-80 را بعنوان بهترین سلولها برای بررسیهای چسبندگی اعلام گرده است و سلول HuTu-80 از آدنوکارسینوم دوازدهه انسان را بعلت حساسیت بیشتر به مواد ممانعت کننده جهت بررسیهای (Inhibition of attachment) انتخاب نموده است.

از سلولهایی که برای چسبندگی هلیکوباکتر پیلوری در In vitro تا به حال گزارش شده‌اند ۷ رده سلولی در بانک سلولی ایران موجود بود که در مطالعه حاضر از آنها استفاده شد و از بین آنها نیز سلول HepII بعلت ایجاد منولایرهای با حداقل Gap بهترین سلول برای آزمایشات بررسی چسبندگی بدست آمد که مطالعه آقای سیمون نیز در بین ۶ رده این نتیجه را تائید می‌کند (۷).

از روشهای سنجش چسبندگی نیز روشهای متعددی گزارش شده‌اند از جمله روشهای کیفی Scaning and Transmision electron: qualitative microscopy (۱۲)، روشهای کمی مثل Radiometric assay باکربن ۱۴ (۱۲) و یاید ۱۲۵ (۱۵)، نشاندار کردن باکتری با مارکرهای فلورسان مثل PKtt26 (۹، ۱۳)، شمارش باکتریهای زنده (۱۰)، روش TLC (۵)، روش ELISA (۷، ۱۴) و UPR (۷) و فلوسایتومتری (۱۳). که هر یک از این روشها دارای مزایا و معایبی از جهت نیاز به دستگاهها و وسایل مجهز، هزینه بالا، Safety و سادگی کار و حساسیت و ویژگی روش می‌باشند. در مطالعه اخیر روش UPR (۷) بعلت نسبتاً ساده بودن روش، در دسترس بودن مواد برای تهیه محلولهای لازم و قابلیت سنجش با دستگاه الایزا ریدر و حساسیت و ویژگی بالا و کمی بودن روش (quantitative)، برای سنجش استفاده شد.

با توجه به بررسیهای به عمل آمده تاکنون در رابطه با چسبندگی این باکتری به سلولهای کشت و موضوعات مشابه تحقیقی در ایران گزارش نشده است. ولی در کشورهای دیگر همانطور که عنوان شد در جهت ارائه سلول مناسب برای چسبیدن این باکتری، مواد مختلف برای استفاده‌های درمانی و پیشگیری و یا جداسازی باکتریهای چسبیده به سولهای کشت، تحقیقات همچنان ادامه دارد (۱۵-۵). تشابهات بین چسبندگی H.pylori به سلولهای کشت نسج و چسبندگی باکتری در In vivo، اهمیت روشهای چسبندگی را مشخص می‌کند که می‌توانند مدلهای مناسبی جهت تحقیق برای تعیین ادهزینهای باکتریایی، گیرنده‌های میزبان، بررسیهای ممانعت از چسبندگی و جداسازی باکتری از سلولها، برای ارائه روشهای جدید درمانی و پیشگیری میسر سازد و روش معرفی شده در این مقاله با استفاده از سلول HepII و همچنین سوشهای جدا شده از بیماران در منطقه خودمان بعنوان روش عملی و مناسب برای اینگونه تحقیقات پیشنهاد می‌گردد.

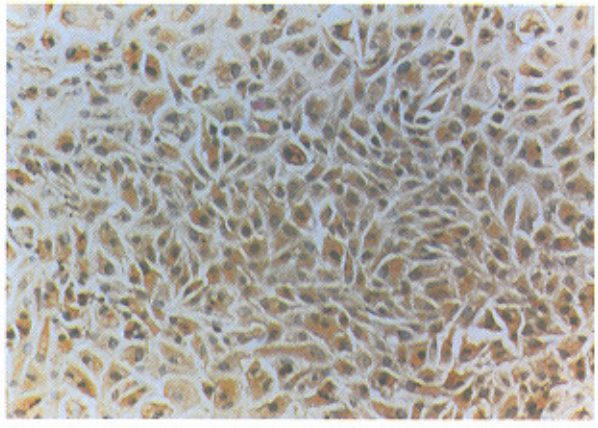
تقدیر و تشکر

از راهنمای جناب آقای دکتر امان زاده سرپرست کنترل کیفی آزمایشگاه بانک سلولی ایران انیستیتو پاستور ایران - تهران، جناب آقای دکتر محمود شمسی شهر آبادی و جناب آقای دکتر منوری ریاست و سوپروایزر آزمایشگاه تخصصی ویروس‌شناسی مجتمع آموزشی، پژوهشی و درمانی حضرت رسول اکرم، جناب آقای دکتر حاجتی معاونت امور مالی دانشکده پزشکی تهران، جناب آقای دکتر همایون مدیریت شرکت فرزانه آرمان و جناب آقایان مهندس تقوی نژاد و مهندس داداشی کارشناسان بخش فنی شرکت فنون آزمایشگاهی بابت کمکهای بیدریغ و بی منت در جهت انجام این تحقیق نهایت سپاسگزاری را می‌نمائیم.

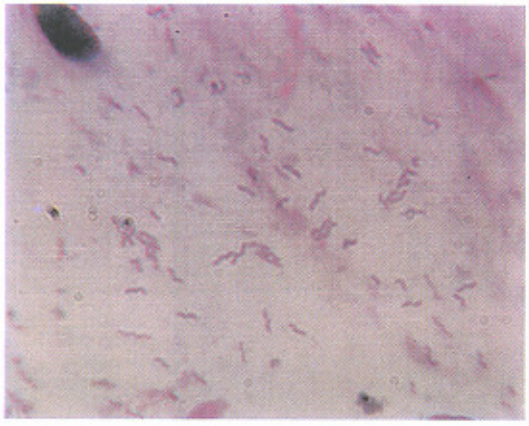
References

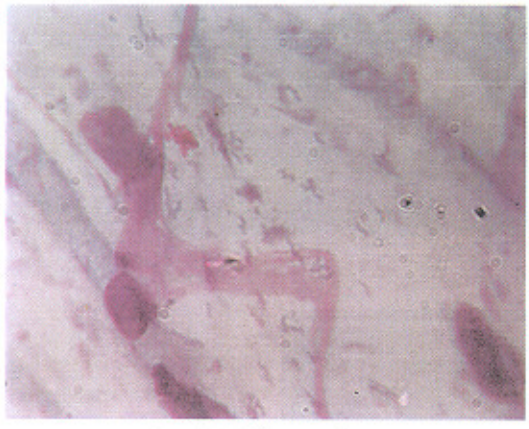
1. Castenhols DR, Boone RW;Bergey manual of systemic bacteriology, Springer, 2001; (1): 161
2. Westblom TU, Czinn SJand Nedrud JG: Gastroduodenal Disease and Helicobacter pylori, Springer, 1999; 320-475
3. Walker TS: Microbiology,Saunders text and review

series, 1998; 169-172
4. Mandell GI: Bennett JE and Dolin R: Mandell, Douglas and Bennett sprinciples and practice of infectious Diseases, fifth ed. Churchil livingston. 2000; 4: 2285-2293
5. Bitzan MM, Benjamin DG, Philpott DJ: Inhibition of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae binding to lipid receptors by bovine colostrum. J Infectious Diseases 1998; 177: 955-961
6. Hata Y, Kita T, Murakami M: Bovine milk inhibits both adhesion of Helicobacter pylori to sulfatide and Helicobacter pylori-induced vaccination of Vero cells. Diag Dis Sci 1999; 44(8): 1696-1702
7. Simon PM, Goode PL, Mobasseri A, Zopf D: Inhibition of Helicobacter pylori binding to gastro intestinal epithelial cells by Sialic acid-containing oligosaccharides.Infection and Immunity 1997; 2: 750-757
8. Murray PR, Baron E Jo, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH: Manual of Clinical Microbiology 7 th ed. ASM press 1999; 723-738
9. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL: Helicobacter pylori, Physiology and Genectics, ASM press, 2001
10. Corthesy-Theulaz I, Porta N: Ahesion of Helicobacter pylori to polarized T84 human intestinal cell monolayers is PH dependent. Infection and Immunity 1996; 9: 3827-3832
11. Guzman-Murillo MA, Ruiz-Bustos E, Ho B, Ascencio F: Involvement of the heparin sulphate-binding proteins of Helicobacter pylori in its adherence to HeLa S3 and Kato III cell lines. J Med Microbiol 2001; 50(4): 320-329
12. Hemalatha SG, Drumm B, Sherman P: Adherence of Helicobacter pylori to human gastric epithelial cells in vitro.J Med Microbiol 1991; 35(4): 197-202
13. Logan RPH, Robins A, Turner GA: A Novel flow cytometric assay for quantitating adherence of Helicobacter pylori to gastric epithelial cells. J Immunological Methods 1998; 213: 19-30
14. Hayashi S, Sugiyama T, Asaka M, Yokota K, Oguma K, Hirai Y: Modification of Helicobacter pylori adhesion to human gastric epithelial cells by antiadhesion agents. Diag Dis Sci 1998; 43(9): 56-60
15. UTT M, Wadstrom T:Identification of heparin sulphate binding surface proteins of Helicobacter pylori: Inhibition of heparin sulphate binding with sulphated carbohydrate polymers. J Med Microbiol 1997; 46: 541-546

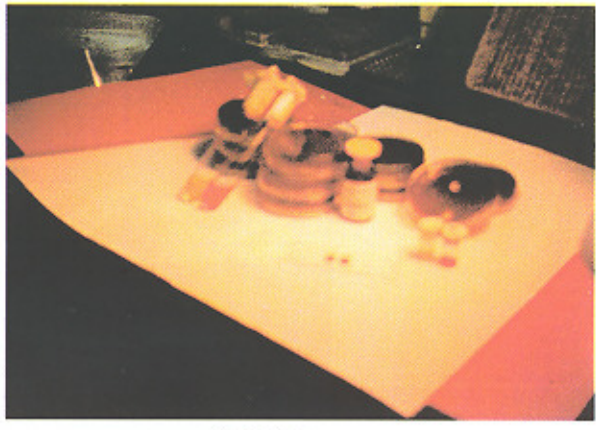


شکل ۲ (صفحهٔ ۱۲۸)

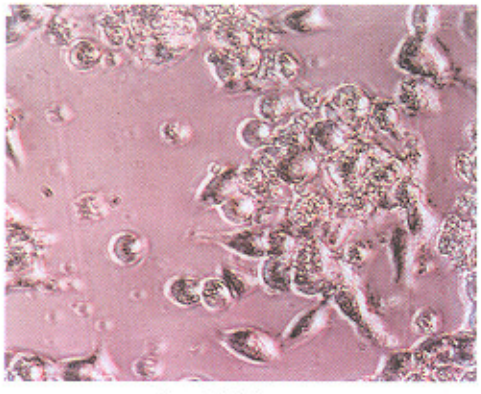




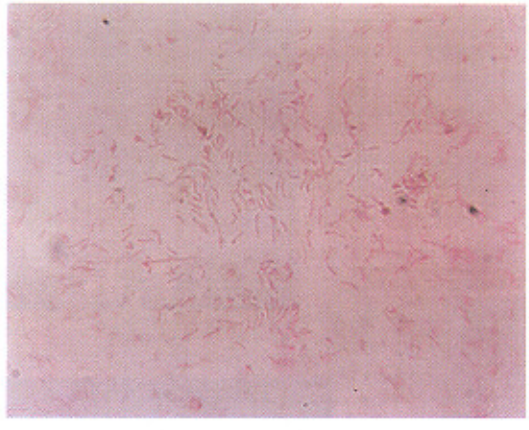
تصاویر 1a و 1b (صفحهٔ ۱۷۹)



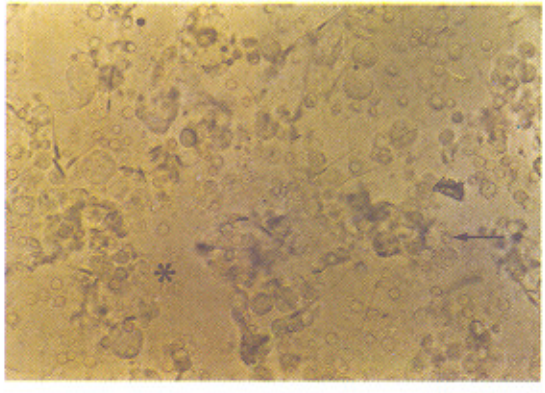
تصویر ۲ (صفحهٔ ۱۷۹)



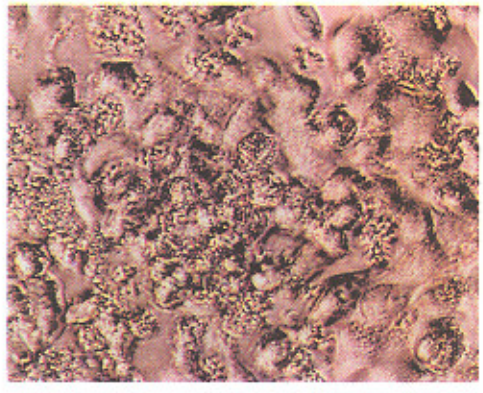
تصویر ۵ (صفحهٔ ۱۸۰)



تصویر ۳ (صفحهٔ ۱۷۹)



شکل ۱ (صفحهٔ ۱۸۶)



تصویر ۴ (صفحهٔ ۱۸۰)