

آنتی ژنهای ایمونوژن شاخص سوشهای *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف دستگاه گوارش

دکتر شهره فرشاد*، دکتر عزیز ژاپونی**، دکتر عبدالوهاب البرزی***، دکتر کامران باقری لنگرانی****
دکتر سیدعلیرضا تقوی*****، مرضیه حسینی*****

دریافت: ۸۷/۱۲/۱۷، پذیرش: ۸۸/۵/۷

چکیده:

مقدمه و هدف: هلیکو باکتر پیلوری (*H. pylori*) یک پاتوژن انسانی میباشد که روی مخاط گوارشی تاثیر گذاشته و سبب یک پروسه التهابی منجر به بیماریهای مختلف معده می شود. عوامل ایجاد کننده پیامدهای مختلف این عفونت کاملاً مشخص نیستند. هدف از این مطالعه، بررسی پروتئینهای ایمونوژن در سوشهای *H. pylori* می باشد که از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف گوارشی جدا شده اند.

روش کار: در این مطالعه توصیفی - مقطعی پروتئین های نام ۱۴۴ سوش *H. pylori* جدا شده از سه گروه بیمار (دارای زخم معده ۳۷ نفر، فاقد زخم ۷۷ نفر و مبتلا به سرطان معده ۳۰ نفر) بوسیله روش سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز یک بعدی (ID-SDS-PAGE) جدا شده و سپس با سرم میزبانهای مربوطه بلات شدند.

نتایج: در این روش اعضای هر گروه بر حسب شباهت در الگوهای پروتئینی ارتباط بالایی را نشان دادند و بنابراین در یک گروه قرار گرفتند. الگوی ایمونوبلاتها با الگوی ژلهای رنگ آمیزی شده با روش کوما سی بریلینت بلو متفاوت بودند. برخی از باندهای پروتئینی جدا شده در SDS-PAGE بوسیله روش بلاتینگ تشخیص داده نشدند. تنها باندهای ۱۰۶ و ۴۵ کیلو دالتونی (KD) سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران با سرطان معده بطور معنی دار اختصاصی با سرمهای بیماران مربوطه شان شناخته شدند ($P < 0/05$) و باند ۱۳KD به صورت اختصاصی با سرمهای بیماران فاقد زخم شناسایی شدند ($P < 0/05$). بجز این باندها، در الگوی بلاتینگ سرمهای تمام بیماران اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه نهایی: این مطالعه با استفاده از روش بلاتینگ یک بعدی، توانست ۲ باند پروتئینی آنتی ژنی ۱۰۶ و ۴۵ کیلو دالتونی برای سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران سرطانی و یک باند ۱۳KD برای سوشهایی که از بیماران فاقد زخمی جدا شده بودند را که بطور اختصاصی با سرم میزبانان مربوطه شان واکنش نشان دادند شناسایی کند.

کلید واژه ها: بیماریهای گوارشی / پروفایل پروتئینی / هلیکوباکتر پیلوری

* دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیشناسی بالینی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (s_farshad@yahoo.com)

** استادیار مرکز تحقیقات میکروبیشناسی بالینی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

*** استاد گروه اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

**** استاد مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز

***** دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز

***** کارشناس مرکز تحقیقات میکروبیشناسی بالینی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مقدمه :

هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایعترین علل عفونت انسان در تمامی دنیا است. این ارگانیزم در لایه مخاطی معده انسان و علیرغم پاسخ ایمنی بدن برای دهها سال و احتمالاً برای تمامی عمر باقی می ماند و باعث بیماریهای مختلف گوارشی مانند ورم معده، زخم معده و سرطان می شود (۴-۱). عوامل وابسته به میزبان، باکتری یا محیط می توانند تعیین کننده پیامدهای طولانی مدت یک عفونت شوند (۱۰-۵). برای افزایش درک *H. pylori* و واکنش متقابل آن با میزبان انسانی، شناسائی پروتئینها و سایر آنتی ژنهایی که سوشهای مختلف *H. pylori* تولید میکنند و نیز پاسخهای سیستم ایمنی انسانی اهمیت بسیاری دارند (۱۱). علاوه براین تفاوت ژنتیکی بالا و تفاوت در تظاهر فاکتورهای بیماریزا در بین سوشهای مختلف *H. pylori* ممکن است در بروز نتایج عفونت تاثیر گذار باشند (۱۴-۱۲). با ازدیاد پیدایش سوشهای هلیکوباکتر پیلوری مقاوم به دارو، ابداع یک واکسن مؤثر می تواند یک جایگزین مناسب برای کنترل یا حتی پیشگیری از عفونت *H. pylori* باشد. بدلیل نا همگونی زیاد در سوشهای *H. pylori* نیاز فراوانی به آنتی ژنهایی که در بین سوشهای مختلف محافظت شده باشند تا بتوانند بعنوان واکسن بکار روند و نیز آنتی ژنهایی که ارزش تشخیصی داشته باشند احساس می شود (۱۷-۱۵). همچنین مشخص شده است که بلا تینگ عصاره پروتئینی کامل باکتری میتواند اساس یک روش سرولوژی غیر تهاجمی جهت ارزیابی عفونت قبلی با *H. pylori* در بیماران مبتلا به گاستریک آتروفیک باشد (۱۸).

برای یافتن این گزینه ها بایستی مارکهای سرولوژیک اختصاصی *H. pylori* که نشانگر یک وضعیت بالینی می باشند تعیین شوند. مقایسه الگوهای تشخیصی آنتی ژنی در سرم بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری مبتلا به وضعیتهای مختلف بالینی مانند مبتلایان به زخم معده یا بیماران فاقد زخم یا افراد مبتلا به سرطان معده شاید بهترین راه دسترسی تشخیص چنین نشانگرهای مناسب باشند.

هدف از مطالعه فعلی یافتن پروتئینهای ایمونوژنیک در سوشهای *H. pylori* جدا شده از بیماریهای مختلف گوارشی بوسیله روش ایمونوبلا تینگ با سرمهای میزبانان

مربوطه شان می باشد. نتایج حاصله می توانند اطلاعاتی را در رابطه با آنتی ژنهای پروتئینی بالقوه جهت استفاده در تشخیص سرولوژیکی و واکسیناسیون فراهم سازند.

روش کار:

بیماران و نمونه ها: در این مطالعه توصیفی - مقطعی تعداد ۱۴۴ بیمار که به دلیل ناراحتی گوارشی به بخش اندوسکوپی بیمارستان نمازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز مراجعه کرده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری و تأیید نوع بیماری گوارشی از نظر آسیب شناسی بوسیله مرکز آسیب شناسی بیمارستان انجام گرفت. از هر بیمار، ۲ نمونه از body و antrum گرفته شده و در محیط انتقالی (حاوی محیط آبگوشتی مغز و قلب غنی شده با ۲۰٪ گلوکز) به آزمایشگاه ارسال شدند. همزمان نمونه های خون از بیماران گرفته شده و پس از انتقال به آزمایشگاه سرم آنها جدا و در دمای C ۲۰- برای استفاده بعدی ذخیره شدند. بیمارانی که در طی دو هفته قبل از اندوسکوپی جهت درمان از آنتی بیوتیک یا مهار کننده پمپ پروتونی و یا ترکیبات بیسموت استفاده کرده و یا عمل جراحی قبلی معده داشتند از مطالعه حذف شدند.

جدا سازی سوشهای هلیکو باکتری پیلوری: نمونه های بیوپسی بیماران به آرامی هموژنیزه شده و بر روی محیطهای اوره آز سریع و بروسلا آگار (Merk, Germany) غنی شده با ۱۰٪ خون لیز شده اسپ و حاوی آنتی بیوتیکهای آمفوترپسین B (۲mg/L)، تری متوپریم (۵ mg/L) و نالیدیسیک اسید (۱۰ mg/L) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان، کشت داده شدند. کشتها به مدت ۵-۱۰ روز در حرارت C ۳۷ در محیط میکروآتروفیلیک (حاوی ۶٪ اکسیژن، ۷/۱٪ دی اکسید کربن، ۷/۱٪ هیدروژن و ۷۹٪ نیتروژن) نگهداری شدند. سپس نمونه ها جهت تأیید وجود هلیکوباکتر پیلوری بر اساس مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم و تستهای اوره آز سریع، اکسیداز و کاتالاز مثبت ارزیابی شدند (۱۹).

تهیه پروتئین تام سلولی: سوشهای *H. pylori* از روی محیط جامد جمع آوری شده و از آن سوسپانسیونی حاوی $10^{10} \times 6$ cfu/ml در PBS استریل تهیه شد. این سوسپانسیون سلولی ۲ بار توسط PBS سرد (M sodium chloride phosphate, ۵۰ mM sodium phosphate, PH=۷/۲) حاوی protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride ۱mM (PMSF; Sigma, USA) شسته شد.

نتایج:

گروه بیماران: طبق یافته های بالینی و آسیب شناسی بیماران به سه گروه تقسیم شدند: بیماران دارای زخم معده (۳۷ نفر)، بیماران فاقد زخم (۷۷ نفر) و بیماران مبتلا به سرطان معده (۳۰ نفر) جدا سازی هلیکوباکتر پیلوری: به ترتیب از body و antrum معده ۲۸ و ۳۰ بیمار دارای زخم ۳۱ و ۳۵ بیمار فاقد زخم و ۱۱ و ۱۳ بیمار سرطانی هلیکوباکتر پیلوری جدا شد. با یافته های پاتولوژی وجود ارگاناسم در این نمونه ها مورد تأیید قرار گرفت. ویژگیهای بیماران شامل سن، جنس و عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ویژگیهای بیماران مورد بررسی در این مطالعه

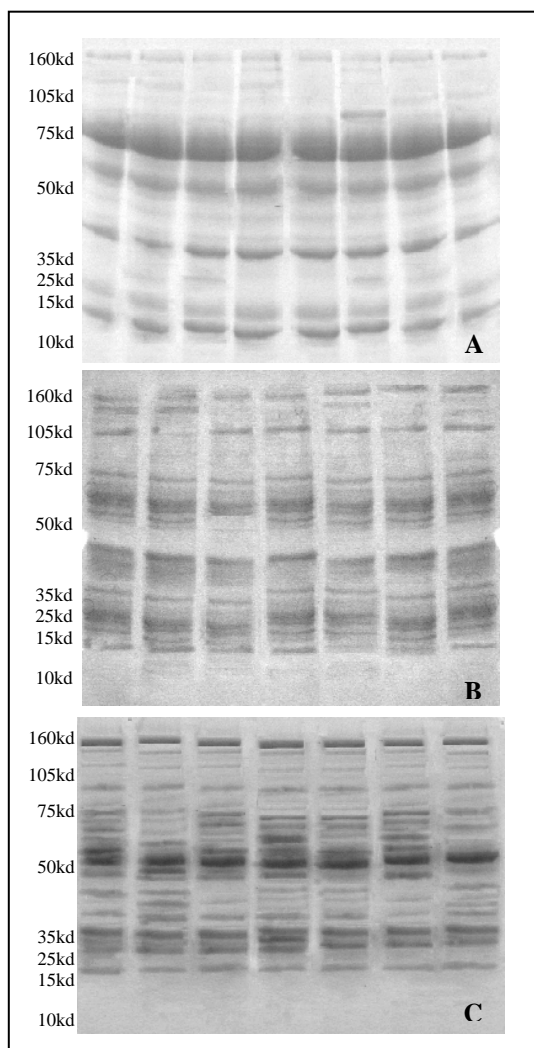
| گروه بیماران | طیف میانگین | | تعداد موارد مثبت هلیکوباکتر پیلوری | | | |
|--------------|-------------|-----------|------------------------------------|----|-------------|----|
| | سن | مذکر مؤنث | پاتولوژی کشت | | Body Antrum | |
| فاقد زخم | ۱۶-۸۰ | ۴۸±۱۵ | ۲۲ | ۴۵ | ۳۱ | ۳۷ |
| دارای زخم | ۱۷-۷۴ | ۴۵/۵±۱۴ | ۲۷ | ۱۰ | ۲۸ | ۳۱ |
| سرطان معده | ۲۹-۷۵ | ۵۲±۱۴ | ۱۸ | ۱۲ | ۱۱ | ۱۴ |

الگوهای پروتئینی SDS-PAGE: الگوهای پروتئینی سوشهای مختلف جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف گوارشی که بوسیله الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید بدست آمدند تفاوتی را در بین الگوها نشان دادند. اعضای هر گروه برحسب شباهتهای الگوهایشان ارتباط بالایی داشتند و بنابراین در یک دسته مشابه قرار گرفتند. شکلهای a تا c الگوهای پروتئینی نمونه هایی از سوشهای شاخص ۳ گروه بیماران را نشان می دهند. بالاترین تعداد باندها در گروه بیماران سرطانی (۲۰ باند) و کمترین تعداد باند در گروه بیماران فاقد زخم (۱۴ باند) مشاهده گردید. باندهای اختصاصی برای اعضای هر گروه شامل باندهای ۱۰۶، ۶۱/۵، ۴۵، ۳۶، ۳۴ و ۳۰ کیلو دالتونی برای گروه بیماران دارای سرطان، باند ۲۲ کیلو دالتونی برای گروه بیماران دارای زخم و باند ۱۳ کیلو دالتونی برای گروه بیماران فاقد زخم بودند. هیچ اختلاف معنی داری بین الگوی پروتئینی گونه های جدا شده از body و antrum بیماران مشاهده نشد.

سپس رسوب باکتری در بافر لیز کننده (۷۵٪ Tris، ۲٪ dodecyl sulfate sodium، ۵٪ dithiothreitol، ۱۰٪ glycerol و ۱٪ bromophenol blue) لیز شد (۲۰). محلول یکنواخت بدست آمده به مدت ۵ دقیقه در بن ماری حاوی آب جوش قرار گرفته و سپس در دمای ۲۰- درجه تا زمان مصرف ذخیره گردید.

SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ: اجزاء پروتئین تام سلولی بوسیله روش SDS-PAGE با دستگاه Hoefer Se/SE 660 (Amersham Pharmacia Biosciences San Francisco, USA) با استفاده از ژل ۱۰٪ طبق روش Laemmli جدا شدند (۲۱). در هر سری آزمایش از مارکر وزن مولکولی Protein Molecular Weight Standards, broad range, (Amersham Biosciences, UK) جهت تعیین وزن مولکولی قطعات پروتئینی نمونه ها استفاده شد. پس از الکتروفورز یک ژل به روش Commassie Brilliant Blue G-250 رنگ آمیزی و ژل دوم از همان نمونه ها طبق روش Sambrook ایمونو بلات شد (۲۲). ژلهای رنگ شده اسکن شده و وزن مولکولی باندهای مربوطه طبق مارکرهای مولکولی پروتئینی تعیین گردید. در بلاتینگ پروتئینها با استفاده از دستگاه Semi-Dri Blotting System (Hoefer دستگاه Amersham Biosciences, San Francisco, USA) TE 77 به غشاء PVD منتقل شدند. بلاتینگ در مدت دوساعت و با شدت جریان ۱ MA/Cm² انجام گرفت. سپس غشاءها برای ۴۵ دقیقه در PBS حاوی ۲٪ آلبومین سرم گاوی در دمای اتاق قرار گرفته و بعد از شستشو با PBS-T (phosphate buffer saline containing 0.65% tween 20) برای مدت ۳ تا ۵ دقیقه، با سرم بیماران که ۱/۸۰ رقیق شده بودند به مدت ۲ ساعت در حرارت اتاق اینکوبه شدند. در مرحله بعد اینکوباسیون در یک رقت ۱/۱۰۰۰ از آنتی سرم peroxidase conjugate coat anti-human polyvalent IgG به مدت ۲ ساعت انجام شد. شستشو در بین زمانهای اینکوباسیون به وسیله PBS-T انجام گشت. پس از ۳ بار شستشو باندهای پروتئینی با اینکوباسیون بلاتها در حرارت اتاق در یک محلول PBS حاوی ۴-۷ μl از 4-chloro-1-naphtol و H₂O₂ (به نسبت وزن به حجم ۰/۱٪) ظاهر شده و سپس واکنش بوسیله شستشو در آب مقطر متوقف شد. بلاتینگ برای هر سوش H. pylori جدا شده از بیماران مختلف با سرم بیماران مربوطه انجام گرفت.

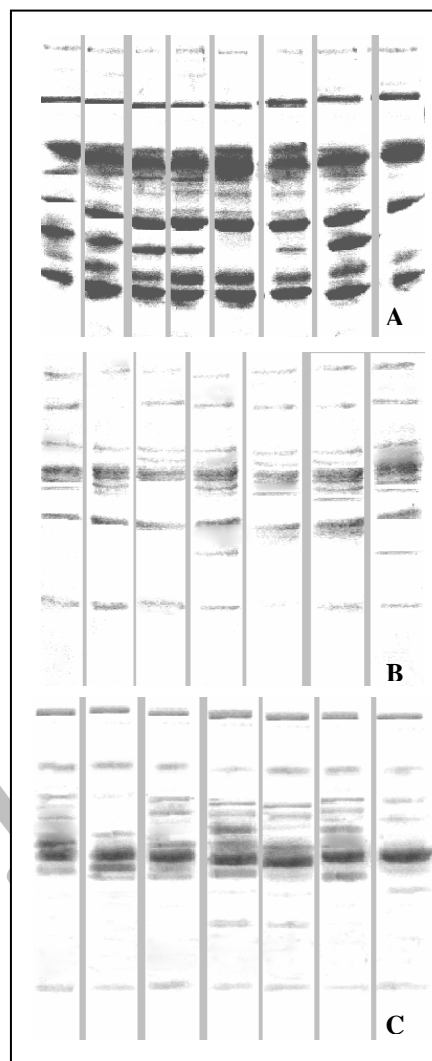
از بیماران سرطانی بطور معنی داری ($P < 0.05$) با سرم بیماران مربوطه شان شناسایی شدند (۸۰٪) و باند ۱۳ کیلو دالتونی بطور اختصاصی با سرمهای بیماران فاقد زخم شناسایی شد. بجز این باندها، هیچ تفاوت معنی داری در الگوی بلاتینگ سرم تمام بیماران مشاهده نشد. باندهای ۱۶۰، ۹۴، ۶۳، ۶۰، ۵۸/۵، ۴۷، ۴۴ و ۱۴ کیلو دالتونی شایع ترین پروتئین های آنتی ژنی در بین سوشهای هلیکوباکتر پیلوری بودند که بطور عمده با سرم میزبانان مربوطه شان شناسایی شدند.



شکل ۲: پروتئینهای آنتی ژنیک سوشهای کلینیکی هلیکوباکتر پیلوری که با سرمهای بیماران مبتلا به بیماری بدون زخم (A)، زخم دار (B) و سرطان معده (C) واکنش داده اند

بحث:

باکتری گرم منفی هلیکوباکتر پیلوری یک پاتوژن انسانی است که مخاط گوارشی را آلوده کرده و سبب یک پروسه التهابی منجر به ورم معده، زخم معده و سرطان



شکل ۱: 1D-SDS-PAGE پروتئین تام ۷ نمونه از سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری بدون زخم (A)، زخم دار (B) و سرطان معده (C)

آنالیز ایمونوبلاتها: به منظور یافتن کاندیدهای پروتئینی آنتی ژنی مورد استفاده در تستهای تشخیصی یا واکنش سوسین، الگوی پروتئینی نمونه های بالینی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم یا سرطان معده که با سرمهای میزبانان آلوده مربوطه شان واکنش داده بودند با الگوی حاصل از بیماران که به بیماری معده بدون زخم مبتلا بودند مقایسه شدند. الگوهای ایمونوبلات (شکلهای ۲a-۲c) با الگوهای بدست آمده از ژلهای رنگ شده با Commassie Brilliant Blue (شکلهای ۱a-۱c) متفاوت بودند. برخی از باندهای پروتئینی بدست آمده در روش SDS-PAGE در روش بلاتینگ ظاهر نشدند. تست آماری نشان داد که تنها باندهای ۱۰۶ و ۴۵ کیلو دالتونی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده

پاتوژنیسیته به سوشهای *H. pylori* در هر گروه از بیماران تاثیر گذار باشند. با استفاده از 2D-Immunoblotting کیمیل و همکاران (۲۶) رابطه ای بین آنتی ژن G27 هلیکوباکتر پیلوری و آنتی بادی ها در بیماران با آسیبهای بافتی خاص دستگاه گوارش پیدا نکردند. در حالیکه در یک مطالعه دیگر در نقشه بلاتینگ دو بعدی ۱۴ نقطه آنتی ژن پروتئینی شناسایی شد که بطور قابل ملاحظه ای در گروه بیماران دارای زخم و بیماران سرطانی تفاوت داشتند (۲۸). در یک مطالعه مینی و همکارانش پروتئینهای مختلف ۳ سوش *H. pylori* که از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف معده جدا شده بودند را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که سوشهای جدا شده از نمونه های سرطانی نسبت به سوشهای جدا شده از نمونه های زخم معده و گاستریت دارای آنتی ژنهای بیشتری بوده و سرم این بیماران نیز پاسخهای ایمنی بیشتری نسبت به دو گروه دیگر بیماران ایجاد کرده بودند (۱۱).

از طرف دیگر هس و همکارانش نیز دریافتند که بیماران زخم دار بیشتر از بیماران مبتلا به گاستریت آنتی بادی تولید می کنند (۲۳). پس میتوان ادعان نمود که همانطور که ما نیز در مطالعه حاضر مشاهده نمودیم طیف واکنش آنتی ژن / آنتی بادی به ترتیب در بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده و سرطان معده بیشتر می شود. این یافته همچنین نشانگر این است که یک طیف مشابه از واکنش ممکن است در هر سه حالت بیماری ایجاد واکنش التهابی کند. برای تعیین نقش دقیق این پروتئین ها و آنتی ژنهای مورد شناسائی در بیماری زای اختصاصی سوشهای *H. pylori* لازم است مطالعات دقیق *in vivo* و *in vitro* صورت گیرد. بهر حال ثابت شده است که بیشتر پروتئینهای ایمونوژنیک *housekeeping* هستند (۲۷). حال این واقعیت که پروتئین های ایمونوژنیک شاخص عمده دارای عملکرد *housekeeping* برای سلول هستند می تواند در تفسیر نتایج محدودیت ایجاد کند چرا که تنها پروتئینهایی که در سلول به مقدار زیاد هستند می توانند شناسایی شوند. بعلاوه دامنه آنتی ژنهای اختصاصی قابل شناسایی با روش 1D SDS-PAGE محدود به پروتئینهایی می باشد که وزنها مولکولی مشابه دارند و دریک باند قرار می گیرند هر چند که امکان دارد اعمال یا خصوصیات آنها بایکدیگرمتفاوت باشد. بعنوان مثال آنتی بادی های علیه پروتئینهای بیماری زا

می شود. مطالعات زیادی برای یافتن پاسخ آنتی بادی نسبت به پروتئینهای *H. pylori* بیان شده در وضعیتهای بالینی مختلف گوارشی انجام گرفته اند اما در تمامی آنها پروتئینهای تنها یک سوش خاص هلیکوباکتر پیلوری با سرمهای بیماران مختلف بلات شده اند (۲۸-۲۳). در اینجا برای یافتن مارکرهای آنتی ژنی که با ظهور علائم اختصاصی بیماریهای وابسته به *H. pylori* مرتبط می باشند، الگوهای آنتی ژنی سوشهای بالینی هلیکوباکتر پیلوری که با سرمهای میزبانان انسانی مربوطه شان واکنش دادند مورد بررسی قرار گرفتند. روش ایمونوبلات بسیار حساس و اختصاصی است و تنها باندهایی را نمایان می کند که بوسیله آنتی بادی های موجود در سرم بیمار شناسایی می شوند. در SDS-PAGE الگوی پروتئینی اعضاء هر گروه از نظر شباهت در الگویشان ارتباط زیادی را نشان دادند که سبب شد در یک دسته مشابه قرار گیرند. بالاترین تعداد باندها در گروه بیماران سرطانی (۲۰ باند) و کمترین تعداد باند در گروه بیماران فاقد زخم (۱۴ باند) مشاهده شد. باندهای اختصاصی برای اعضای هر گروه شامل باندهای ۱۰۶، ۶۱/۵، ۴۵، ۳۴ و ۳۰ کیلو دالتونی برای بیماران دارای سرطان، باند ۲۲ کیلو دالتونی برای گروه بیماران دارای زخم و باند ۱۳ کیلو دالتونی برای گروه بیماران فاقد زخم بودند. اگرچه تفاوتهای بسیار کمی بین سوشهای جدا شده از *antrum* و *body* هر بیمار مشاهده گردید اما بنظر نمی رسد که در الگوی تولید پروتئینهایی که بتوان به محل جدا کردن هلیکوباکتر پیلوری از معده نسبت داده شود تفاوت معنی داری وجود داشته باشد. معهدا، در بلاتینگ فقط باند های ۱۰۶ و ۴۵ کیلو دالتونی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران با سرطان معده بطور معنی داری بطور اختصاصی با سرم بیماران مربوطه شان (۸۰٪) شناسایی شدند و باند ۱۳ کیلو دالتونی بطور اختصاصی با سرم بیماران فاقد زخم (۸۵٪) شناسایی شدند. به استثناء این باندها در الگوی بلاتینگ سرم تمام بیماران تفاوت معنی داری مشاهده نشد. این یافته نشان داد که برخی پروتئینهای یافت شده در SDS-PAGE سه گروه سوش *H. pylori* برای میزبانان خود ایمونوژنیک نبودند. بنابراین دو پروتئین ۱۰۶ و ۴۵ کیلو دالتونی در سوشهای *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان معده و یک پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی در سوشهای *H. pylori* جدا شده از بیماران فاقد زخم می توانند درالقاء خصوصیت

منابع :

- Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994; 94: 4-8.
- Tompkins LS, Falkow S. The new path to preventing ulcers. *Science* 1995; 267: 1621-1622.
- IARC working Group on the Evaluation of Carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC. *Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61:1-241.
- Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; 615-40.
- Haas R, Meyer TF, Van Putten JPM. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol* 1993; 8: 753-760.
- Cussac V, Ferrero RL, Labigene A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen limiting conditions. *J Bacteriol* 1992; 174: 2466-2473.
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-377.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-31.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniguchi K, Sasaki N, Schlemper R.J. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-9.
- Mini R, Bernardini G, Maria Salzano A, Renzoni G, Scaloni A, Figura N, Santucci A. Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. *J Chromatography* 2006;833:63-79.
- Jungblunt PR, Bumann D, Haas G, Zymny-Arndt U, Holland P, Lamer S, et al. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2000; 36: 710-25.
- Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397: 176-80.
- Bumann D, Meyer TF, Jungblunt PR. Proteome

و housekeeper که وزن مولکولی یکسانی دارند تنها یک باند را در بلاتینگ برای سوشهای مختلف شناسایی می کنند. این محدودیتها را می توان تا حدودی با استفاده از روش 2D SDS-PAGE یا Iso Electro Focusing (IEF) برطرف کرد. علیرغم اثبات اینکه روش ایمونوبلاتینگ روش مفیدی جهت شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک می باشد اما یافتن شاخصهای آنتی ژنیک مرتبط با علائم بالینی خاص دستگاه گوارش به عللی نمی تواند موفقیت آمیز باشد :

الف- پاسخ ایمنی میزبان : در برخی موارد بعلت نقص ایمنی ، سیستم ایمنی میزبان نمی تواند به پروتئینهای آنتی ژنیک باکتری پاسخ دهد و بنابراین هیچ هیبریداسیونی در بلا تینگ قابل مشاهده نخواهد بود.

ب - عوامل ژنتیکی : احتمالاً عوامل ژنتیکی باکتری و میزبان می تواند نتیجه بالینی عفونت هلیکوباکتر پیلوری را تحت تاثیر قرار دهد.

ج - بیان عوامل بیماریزا : شرایط کشت *in vitro* می تواند بیان برخی عوامل بیماریزا را که بیان آنها به فاکتورهای تحریک کننده *in vivo* بستگی دارد سرکوب کند.

د - سن در زمان عفونت و دوره عفونت : بیماران مبتلا به سرطان معده به طور میانگین از لحاظ سن مسن تر از بیماران دارای زخم معده هستند و بنابراین احتمالاً برای مدت طولانی تری در زمان حیاتشان هلیکوباکتر پیلوری را با خود حمل می کنند.

نتیجه نهایی :

در این مطالعه با استفاده از روش ID-blotting توانستیم دو باند پروتئینی آنتی ژنی ۱۰۶ و ۴۵ کیلودالتونی را در سوشهای *H. pylori* جدا شده از بیماران سرطانی و یک باند ۱۳ کیلو دالتونی را در سوشهای جدا شده از بیماران فاقد زخم جدا کنیم که بطور اختصاصی با سرم بیماران مربوطه شان قابل شناسایی بودند. برای نشان دادن ارزش آنتی ژنهایی که در اینجا شرح داده شده اند در پیشگویی وضعیتهای بالینی خاص به مطالعات بیشتری نیاز می باشد.

سپاسگزاری:

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز تحت طرح تحقیقاتی شماره ۵-۸۱ انجام گرفته است. نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از سرکار خانم دکتر فاطمه امام قریشی برای همکاری در بررسی آماری این مطالعه ابراز می دارند.

- analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics* 2001; 1: 473-9.
15. Westblom TU, Unge P. Drug resistance of *Helicobacter pylori*: memorandum from a meeting at the Sixth International Workshop on Campylobacter, *Helicobacter*, and related organisms. *J Infect Dis* 1992; 165: 974-975.
 16. Corthesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, Saraga E, Vaney AC, Haas R, et al. Oral. Immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter* infection in mice. *Gastroenterology* 1995; 109: 115-121.
 17. Rapouli R, Covacci A, Ghiara P, Telford J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* and perspectives of vaccine development against an emerging pathogen. *Behring INS Mitt* 1994; 95:42-48.
 18. Mini R, Annibale B, Lahner E, Bernardini G, Figura N, Santucci A. Western blotting of total lysate of *Helicobacter pylori* in cases of atrophic body gastritis. *Clin Chemis* 2006; 52: 220-226.
 19. Farshad Sh, Alborzi A, Malek Hosseini SA, Oboodi B, Rasouli M, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in Iranian patients with gallstones. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 1185-1189
 20. She FF, Su DH, Lin JY, Zhou LY. Virulence and potential pathogenicity of coccoid *Helicobacter pylori* induced by antibiotics. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 254-8.
 21. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 22. Sambrook J, Russell, DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. Vol 3. New York: Cold Spring Harbor, 2001: A8.40-A8.51.
 23. Hass G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* 2002; 2: 313-24.
 24. Iaquinto G, Todisco A, Perri F, Rega C, de Chiara G, Landi M, et al. Antibody response to *Helicobacter pylori* Cag A and heat-shock proteins in determining the risk of gastric development. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 378-83.
 25. Krah A, Muhlke S, Pleissner KP, Zimny-Arndt U, Kiesch C, Lehn N, et al. Identification of candidate antigens for serologic detection of *Helicobacter pylori* - infected patients with gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 108: 456-63.
 26. Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* 2000; 68:915-20.
 27. Nilsson I, Utt M. Separation and surveys of proteins of *Helicobacter pylori*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 771: 251-260.
 28. Nilsson CI, Larsson T, Gustafsson E, Karisson KA, Davidsson P. Identification of protein vaccine candidates from *Helicobacter pylori* using a preparative Two-Dimensional Electrophoretic procedure and Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2000; 72: 2148-2153.

Archive of SID