

Received: 2012.08.20
Accepted: 2013.11.21
Published: 2014.03.04

Formy morfologiczne *Helicobacter pylori* i ich przypuszczalna rola w transmisji zakażeń*

Helicobacter pylori morphological forms and their potential role in the transmission of infection

¹Karolina Rudnicka, ¹Maciej Graczykowski, ²Michał Tenderenda, ¹Magdalena Chmiela

¹Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

²Klinika Chirurgii Onkologicznej i Ogólnej, Wydział Nauk Medycznych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie

Ponad połowa światowej populacji ludzi jest zakażona *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) – Gram-ujemną bakterią, będącą przyczyną rozwoju wrzodów żołądka i dwunastnicy, a także jednym z istotnych czynników w etiopatogenezie raka żołądka. *H. pylori* występuje głównie w formie pałeczkowatej, która w zależności od liczby skrętów może przyjmować postać spiralną lub S-kształtną. Formy pałeczkowate *H. pylori* są głównie izolowane z biopłatów błony śluzowej żołądka lub dwunastnicy oraz ze świeżych hodowli prowadzonych na podłożach bakteriologicznych. Badania z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały, że kilkudniowe hodowle *H. pylori*, oprócz klasycznych form pałeczkowatych, zawierają kuliste postacie ziarniakowate. Dalsze badania pozwoliły dokonać podziału form ziarniakowatych *H. pylori* na dwa podtypy: postać żywą, lecz nie hodowlaną, tzw. VBnC (viable but non culturable) oraz formę degeneratywną, prawdopodobnie będącą przejawem śmierci komórki bakteryjnej. Transformacja formy spiralnej do kulistej jest indukowana czynnikami szkodliwymi m.in. obecnością antybiotyków. Jednak do dziś nie wykazano rewersji formy ziarniakowatej do żywej, zakaźnej formy pałeczkowatej. Udowodniono natomiast, że postać kokoidalna jest formą dominującą w biofilmach jedno- lub wielogatunkowych tworzonych z udziałem *H. pylori*. Nie wszystkie formy morfologiczne *H. pylori* charakteryzują się tym samym repertuarem antygenowym, właściwościami immunomodulującymi czy zakaźnymi, a różnice w powyższych właściwościach pozwalają na określenie typów morfologicznych, które potencjalnie mogą brać udział w transmisji zakażeń wywołanych przez *H. pylori*. Niniejsze opracowanie ma na celu ukazanie aktualnej wiedzy na temat zróżnicowania form morfologicznych *H. pylori* w zakresie właściwości antygenowych i zakaźnych z uwzględnieniem ich przypuszczalnego znaczenia w epidemiologii.

Słowa kluczowe:

H. pylori • formy morfologiczne • pałeczka • forma ziarniakowata

Summary

More than 50% of the world's population is infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) – a Gram negative bacterium, which persists in the human stomach and duodenum, causing gastric or duodenal ulcers and gastric cancer. The majority of *H. pylori* cells demonstrate rod-shape morphology occurring in two subtypes: spiral and S-shaped. Both are isolated from mucus layer biopsy specimens of the stomach or from short-term cultures. However, results obtained from

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków KBN NN 303451738 oraz stypendium doktoranckiego współfinansowanego przez Fundusz Unii Europejskiej w ramach projektu „Stypendia wspierające innowacyjne projekty badawcze doktorantów”.

electron microscopy revealed that *H. pylori* long-term cultures not only consist of classic, spiral shaped bacteria, but also contain alternative forms of coccoid cells. Further investigations showed that coccoid forms of *H. pylori* may be divided into two types: viable but non-culturable coccus (VBnC) and a degenerative form, coccoid stage which is probably the effect of bacterial cell death. Transformation from spiral to coccoid form is induced under stress conditions, such as the presence of antibiotics. But still there is no evidence for reversion from the coccoid state to the viable and infectious spiral form. Besides the planktonic form, *H. pylori* also forms homo-, and heterogenic biofilms, which may constitute a potential environmental reservoir of this bacterium. The antigenic repertoire and the immunomodulatory and infectious properties of different *H. pylori* forms differ greatly. The variation in those properties suggests that morphological forms of *H. pylori* are potentially involved in the transmission of the infection. This review presents recent findings on the variability, antigenicity and infectious properties of *H. pylori* morphological forms and their potential role in the transmission of the infection.

Keywords: *H. pylori* • morphological forms • rod • coccoid form

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1092705>

Word count: 4120
Tables: 1
Figures: 2
References: 70

Adres autorki: mgr farm. Karolina Rudnicka. Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: rudnicka@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **AGS** – linia ludzkich komórek nowotworowych raka żołądka (human gastric cancer cell line); **AlpA/B** – rodzina białek błony zewnętrznej *H. pylori*; **BabA** – adhezyna wiążąca antygeny grupowe krwi (blood group antigen binding adhesion); **CagA** – białko Cag A związane z cytotoxyną (cytotoxin-associated gene A antigen); **EPS** – zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa (extracellular polymer substance); **GES-1** – linia ludzkich komórek nabłonkowych błony śluzowej żołądka (human gastric epithelial mucosa cell line); **Hep-2** – linia ludzkich komórek nabłonkowych (human epithelial cell line); **HLO** – organizmy helikobakteropodobne (Helicobacter-like organisms); **Hsp** – białko szoku cieplnego (heat shock protein); **HtrA** – proteinaza serynowa *H. pylori*; **Ig** – immunoglobuliny; **IL** – interleukina; **KATO III** – linia ludzkich komórek raka żołądka; **LPS** – lipopolisacharyd; **MALT** – tkanka limfoidalna błon śluzowych (mucosa associated lymphoid tissue); **OMV** – pęcherzyki zewnątrz błonowe (outer membrane vesicles); **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction); **PG** – peptydoglikan; **qPCR** – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (quantitative polymerase chain reaction); **PMA** – monoazyd propidyny (propidium monoazide); **SabA** – adhezyna A wiążąca kwas sialowy A (sialic acid-binding adhesion); **SDS-PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym przeprowadzana w obecności dodecylosiarczanu sodu (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis); **TLR** – receptory Toll-podobne (Toll like receptor); **UreA/B/C/I/E** – podjednostki ureazy *H. pylori*; **VacA** – toksyna wakuolizująca (vacuolating cytotoxin gene A); **VBnC** – postać żywa, niehodowalna (viable but nonculturable); **WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization).

WPROWADZENIE

Helicobacter pylori (*H. pylori*) to Gram-ujemna, biegunowo urzęsiona bakteria mikroaerofilna, zasiedlająca błonę śluzową żołądka i dwunastnicy ponad połowy populacji ludzi [2,6]. Izolacja *H. pylori* z błony śluzowej żołądka zapoczątkowała badania, które wykazały, że drobno-ustrój ten jest głównym czynnikiem etiologicznym wrzodów żołądka. Odkrywczy, a zarazem autorzy pracy potwierdzającej związek zakażeń *H. pylori* z występowaniem

choroby wrzodowej, zostali uhonorowani w 2005 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii [41]. Udowodniono również, że *H. pylori* jest jedynym bakteryjnym karcynogenem klasy I, który może być przyczyną gruczolakoraka oraz chłoniaka żołądka typu MALT [3].

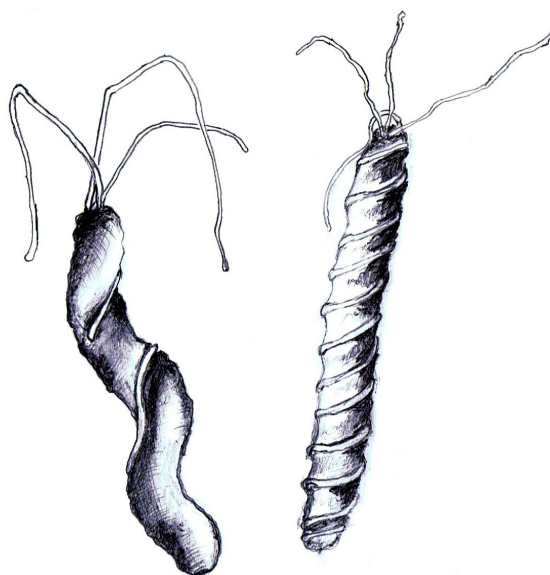
Szacuje się, że ponad połowa populacji ludzi jest zakażona *H. pylori*, co plasuje tę bakterię w czołowie listy patogenów bakteryjnych człowieka [10,15]. Jednak tylko

u 15-20% zakażonych infekcja przeradza się w postać objawową [17,21,40]. Przyczyną zróżnicowanego przebiegu zakażenia jest z jednej strony zmienność antygenowa *H. pylori*, a z drugiej osobniczo determinowana odpowiedź immunologiczna makroorganizmu, dodatkowo modulowana antygenami *H. pylori* [29,54,56]. Początkowo przyjmowano, iż jedyną formą morfologiczną *H. pylori* jest postać pałeczkowata. Jednak w niedługim czasie po opublikowaniu pracy na temat powiązania zakażenia *H. pylori* z chorobą wrzodową żołądka, pojawiły się doniesienia o istnieniu formy ziarniakowatej [7]. Odkrycie postaci ziarniakowatej *H. pylori* zapoczątkowało dyskusję na temat jej stanu fizjologicznego, aktywności metabolicznej oraz potencjalnych właściwości zakaźnych. Kontrowersje wokół istnienia formy alternatywnej *H. pylori* były dodatkowo podsycane brakiem naukowo potwierdzonego środowiskowego źródła zakażenia [10]. Wydaje się, że skoro część populacji ludzkiej jest bezobjawowo skolonizowana przez *H. pylori*, bakterie te wraz z wydalnikami (kałem) lub jak postulują niektórzy autorzy, wydzielinami (śliną) mogą trafiać do środowiska i stanowić źródło kolejnych zakażeń [10,64]. Co ciekawe, do dziś nie przedstawiono niepodważalnego dowodu na rozwój *H. pylori* poza naturalną niszą tych drobnoustrojów, jaką jest błona śluzowa żołądka.

FORMA PAŁECKOWATA *H. PYLORI*

Forma pałeczkowata jest dominującą postacią *H. pylori* najczęściej izolowaną z bioptatów żołądka osób zakażonych, a stwierdzenie obecności helikalnie skręconych pałeczek tzw. Helicobacter Like Organisms (HLO), jest jednym z etapów diagnostyki *H. pylori* [13,42,52,53,58]. Przeciętna pałeczka ma około 5 μm długości oraz 0,5 μm średnicy i zawiera 5-7 biegunowo umiejscowionych rzęsek [2,16]. Zróżnicowanie liczby rzęsek pozwoliło na wyróżnienie dwóch podtypów: postaci spiralnej (helikalnej), o wysokim stopniu skręcenia komórki bakteryjnej oraz pałeczkowatej (zawierającej nieliczne osie skrętu lub całkowicie ich pozbawionej), która często przyjmuje tzw. postać S-kształtną (ryc. 1) [19,59].

Komórka otoczona jest typową dla bakterii Gram-ujemnych ścianą, składającą się z błon: zewnętrznej i wewnętrznej, przedzielonych przestrzenią periplazmatyczną. Struktura peptydoglikanu (PG) *H. pylori* jest mniej skomplikowana niż u innych bakterii Gram-ujemnych. Charakterystyczny dla *H. pylori* skład PG prawdopodobnie determinuje helikalną morfologię tej bakterii [6,22]. Przypuszcza się, że skręcenie komórki bakteryjnej jest związane ze zmniejszoną liczbą krzyżowych wiązań peptydowych w warstwie PG. W celu przystosowania się do warunków środowiska pałeczki *H. pylori* modyfikują skład peptydoglikanu [14]. W proces ten zaangażowane są m.in. endonukleazy oraz białko HP 0506. Peptydoglikan *H. pylori* zawiera liczne muropeptydy zakończone pięciopeptydowymi łańcuchami, zbudowanymi z kwasu (1-6)-anhydro-N-acetylomuramidowego i glicyny. Ponadto peptydoglikan *H. pylori* jest pozbawiony częste-



Ryc. 1. Zróżnicowanie form pałeczkowatych *H. pylori*: forma S-kształtna (z lewej strony), forma helikalna (z prawej strony) [aut. K. Rudnicka]

czek typowych dla mureiny innych bakterii Gram-ujemnych, tj. trimerycznych i (L-D)-krzyżowo związanych muropeptydów [14,19]. Spiralny kształt pełni główną rolę w ruchliwości bakterii, która jest uznawana za czynnik patogenności pozwalający na przetrwanie *H. pylori* w zmieniającym się środowisku żołądka [14]. Mutanty pozbawione skrętów mają ograniczoną zdolność kolonizacji błony śluzowej żołądka. Przypuszcza się również, że morfologia formy spiralnej może mieć wpływ na rozmieszczenie białek zewnątrz błonowych, co w przypadku adhezyn może wpływać na skuteczność przylegania bakterii do komórek nabłonka oraz komórek układu odpornościowego [15,17,18,39].

Skład błony komórkowej formy spiralnej *H. pylori* jest także unikatowy. Spośród kwasów tłuszczowych, największy odsetek stanowią kwas mirystynowy (31-40%) i 19-węglowy kwas cyklopropanowy (20-24%). Ponadto komponentami błony komórkowej są kwasy: palmitynowy, stearynowy, linolenowy, oleinowy, β -hydroksypalmitynowy i β -hydroksystearynowy (stanowiące 12% wszystkich kwasów tłuszczowych). We frakcji fosfolipidowej dominują fosfatydyloetanoloamina, kardiolipiny, fosfatydyloglicerol oraz lipopolisacharydy (LPS) [4,8,19,43]. Formy spiralne *H. pylori* wytwarzają liczne białka pełniące rolę adhezyn, enzymów i toksyn. Do najważniejszych antygenów występujących na powierzchni form spiralnych *H. pylori* należą m.in.: enzymy (ureaza, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa), adhezyny (białka SabA, BabA, AlpA, AlpB), poryny (białka rodziny Hop), hemaglutyniny, flageliny oraz białka warunkujące inwazyjność, tj. toksyna wakuolizująca VacA i białka wyspy patogenności PAI (głównie CagA) [8,15,16,54].

FORMA ZIARNIAKOWATA *H. PYLORI*

Tworzenie form ziarniakowatych jest właściwością powszechnie występującą wśród drobnoustrojów Gram-ujemnych. Procesy te zachodzą zwykle w niesprzyjających warunkach, np. przy braku substancji odżywczych lub obecności antybiotyków w środowisku wzrostu [50,57]. Podejrzewa się, iż transformacji z formy pałeczkowatej do kokoidalnej towarzyszy utrata zdolności wzrostu na podłożach mikrobiologicznych [36,45]. Stąd, mimo wielu lat badań, środowisko naukowe nadal nie ma pewności, czy postać kokoidalną *H. pylori* należy zaliczyć do postaci żywych, w warunkach laboratoryjnych nie poddaje się hodowli VBnC (viable but non culturable), czy traktować je jako przejaw śmierci komórki bakteryjnej [13,37]. Dotychczasowe badania dostarczają dowodów potwierdzających zarówno pierwszą jak i drugą hipotezę [2,4,13,25,36,37,45,59].

VBnC to żywa postać bakterii niezdolna do wzrostu na znanych, klasycznych pożywkach hodowlanych, indukowana niesprzyjającymi warunkami środowiska. Co ważne, formy określane mianem VBnC, po zastosowaniu odpowiedniego induktora lub przy zmianie warunków hodowli mogą odzyskać zdolność wzrostu na podłożach sztucznych i zwykle powracają do swojej pierwotnej postaci morfologicznej. Istnienie form VBnC wykazano m.in. dla takich drobnoustrojów jak *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio vulnificus*, *Mycobacterium tuberculosis* oraz u bakterii z rodzaju *Campylobacter* spp. (blisko spokrewnionych z *Helicobacter*) [36,50]. Właściwości form VBnC, tj. duża oporność na niesprzyjające warunki środowiska oraz zdolność konwersji do formy zakaźnej sprawiają, że rozpatruje się ich rolę w etiologii zakażeń latentnych oraz reinfekcji [50].

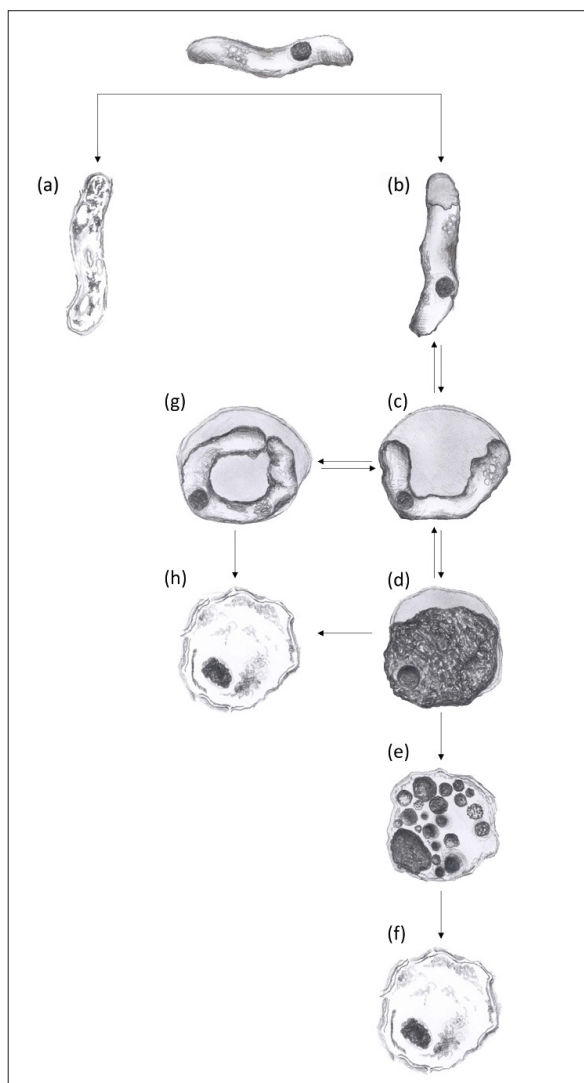
Formy VBnC są mniejsze od postaci natywnych, a w składzie ich błon komórkowych znajdują się liczne białka indukowane stresem, m.in. białka szoku cieplnego należące do grupy Hsp (heat shock protein). Ponadto zaobserwowano zmiany w budowie peptydoglikanu będące następstwem skracania łańcuchów glikanowych oraz wzrostem ilości mukopeptydów niosących kowalencyjnie związane lipoproteiny [6,19]. Do generacji form żywych, niehodowlalnych dochodzi zazwyczaj w warunkach niekorzystnych dla wzrostu drobnoustrojów. Do czynników indukujących tworzenie VBnC zalicza się m.in. długotrwałą hodowlę na podłożach płynnych lub stałych, stres oksydacyjny, niedobór substancji odżywczych, akumulację metabolitów w środowisku wzrostu, obecność antybiotyków, jonów metali ciężkich, nagłą zmianę temperatury środowiska hodowlanego lub nawet ekspozycję na światło. Odpowiedzią bakterii na powyższe warunki stresowe jest utracenie zdolności wzrostu w postaci kolonii na podłożach sztucznych, nawet przy zachowaniu ich żywotności [4,7].

ZRÓŻNICOWANIE I POWSTAWANIE FORM ZIARNIAKOWATYCH *H. PYLORI*

Istnienie form VBnC *H. pylori* nadal pozostaje w sferze przypuszczeń. Zgodnie z definicją, postać ta powinna spełniać warunek żywotności i mieć zdolność ponownej konwersji do formy pierwotnej, co w przypadku *H. pylori* nadal nie zostało jednoznacznie potwierdzone [2,4,7,11,13,45,50].

Podobnie jak w przypadku innych gatunków bakterii Gram-ujemnych, formy kokoidalne *H. pylori* są często izolowane z kilkudniowych hodowli prowadzonych na podłożach stałych lub płynnych. Ich obecność wykazano już w trzecim dniu hodowli. Natomiast odsetek form kokoidalnych w 7-dniowej hodowli osiąga nawet 99% [2,20,52]. Czynniki inicjującymi transformację formy spiralnej *H. pylori* do ziarniakowatej są: pH środowiska, temperatura lub obecność antybiotyków w pożywkach. Ostatni z wymienionych czynników może tłumaczyć intensywne tworzenie form kokoidalnych *H. pylori* na podłożach referencyjnych ze względu na obecność suplementu Skirrow zawierającego zestaw antybiotyków hamujących wzrost mikroflory towarzyszącej zanieczyszczającej wycinki błony śluzowej żołądka pobierane podczas zabiegu gastrokopii [50]. Proces przekształcania pałeczek *H. pylori* w postać ziarniakowatą został dobrze udokumentowany zdjęciami z elektronowego mikroskopu transmisyjnego [4,16] (ryc. 2). W pierwszym etapie transformacji na jednym z biegunów komórki, powstaje pęcherzyk wewnątrzkomórkowy wypełniony materiałem o większej gęstości elektronowej (ryc. 2a). Struktura ta zaczyna się rozrastać, co powoduje stopniowe wyginanie się komórki. Postępująca transformacja skutkuje utworzeniem tzw. komórek U-kształtnych (ryc. 2b), z których następnie tworzone są formy ziarniakowate (ryc. 2d). W przebiegu transformacji formy U-kształtnej do ziarniakowatej, może powstawać postać tzw. donat-shaped, czyli przypominająca obwarzanek forma połączonej biegunami pałeczki [59] (ryc. 2g). Należy nadmienić, że konwersja formy pałeczkowatej do postaci U-kształtnej lub formy L jest dwukierunkowa [31,66]. Transformacji morfologicznej towarzyszy wiele zmian wewnątrzkomórkowych. Nowo powstała postać sferyczna ma integralny system błon komórkowych i nienaruszoną ścianę komórkową oraz wykazuje obecność organelli i ziarnistości cytoplazmatycznych. Wraz z przedłużającą się hodowlą ich powierzchnia ulega pofałdowaniu, a ziarnistości wewnątrzkomórkowe zanikają. Następnie konsystencja cytoplazmy staje się jednolita, dochodzi do rozpadu organelli, utraty ciągłości błony komórkowej i postępującej wakuolizacji [6,59] (ryc. 2e). Przypuszczalnie są to oznaki obumierania żywej formy VBnC i jej przekształcania w postać degeneratywną (resztkową). Ostatecznym etapem w cyklu transformacji pałeczek do form kokoidalnych, początkowo żywych, a następnie degeneratywnych, jest śmierć komórki bakteryjnej (ryc. 2f, h). Cellini i wsp. dowiedli, że większość komórek kokoidalnych oraz nieliczne formy spiralne obumierają w wyniku apoptozy [13]. Sato i wsp. na podstawie

obserwacji z użyciem mikroskopu elektronowego, proponują podział form kokoidalnych *H. pylori* na dwa podtypy: A (odpowiednik żywych form sferycznych) oraz B (odpowiednik form degeneratywnych) [59].



Ryc. 2. Przepuszczalne przemiany form morfologicznych *H. pylori*.

Postać pałeczkowata (S-kształtna) może obumierać nie zmieniając się morfologicznie (a). Pierwszym etapem transformacji do formy ziarniakowatej jest utworzenie pęcherzyka na jednym z biegunów komórki (b), następnie pałeczka wygina się w kształt litery U (c) lub przyjmuje postać kokoidalną (d). Obumieranie zarówno postaci U-kształtnej, jak i ziarniakowatej może prowadzić do utworzenia formy degeneratywnej (reszkowej) (h,f). Procesowi obumierania komórki w formie kokoidalnej często towarzyszy silna wakuolizacja (g)
[aut. K. Rudnicka]

Podobnie jak w przypadku form helikalnych, istnienie postaci kokoidalnej jest determinowane procesami rearanżacji peptydoglikanu [8,19]. Transformacji towarzyszy ponadto nadekspresja genu kodującego białko Hp0506 oraz jedna z hydrolaz peptydoglikanu - produkt genu *amiA*. *H. pylori* z mutacją genu *amiA* ma ograniczoną zdolność transformacji do formy ziarniakowatej

[14,19]. Niektórzy autorzy postulują istnienie tzw. form L *H. pylori*. Jest to postać indukowana głównie antybiotykami ingerującymi w syntezę peptydoglikanu. Osłabienie struktury PG prowadzi do deformacji komórki, która w efekcie wygina się w kształt litery L.

ŻYWOTNOŚĆ I WŁAŚCIWOŚCI ANTYPENOWE FORM ZIARNIAKOWATYCH *H. PYLORI*

Kontrowersje związane z żywotnością form kokoidalnych *H. pylori* są wynikiem braku niepodważalnych dowodów potwierdzających ich aktywność metaboliczną. Dotychczas nie udało się przeprowadzić transformacji formy kokoidalnej w pałeczkowatą charakteryzującą się inwazyjnością, podczas gdy wielokrotnie wykazano możliwość konwersji postaci spiralnej do ziarniakowatej [4,6,7,19,58,59]. Trudność ze zbadaniem czy transformacja ta jest dwukierunkowa, wiąże się z dużym prawdopodobieństwem, iż w puli form kokoidalnych wygenerowanych do celów doświadczenia, znajdują się także pozostałości form spiralnych, które nie uległy konwersji morfologicznej [50,65]. Wyniki uzyskane przez dwie niezależne grupy badawcze wydają się wspierać tezę o odwracalności transformacji. W obu przypadkach, zastosowanie bogatych w płynnych podłożu pozwalało, z materiału zawierającego >99% form ziarniakowatych po 7 dniach inkubacji, uzyskać hodowlę składającą się głównie z form spiralnych oraz licznych form reszkowych [2,45,58,59]. Nie można jednak wykluczyć, że uzyskana w ten sposób populacja wywodzi się z kilku komórek spiralnych, które nie uległy konwersji do stanu kokoidalnego.

Odpowiedź na pytanie, czy istnienie formy kokoidalnej *H. pylori* jest sposobem na przetrwanie bakterii poza ustrojem człowieka, jest podstawą zrozumienia epidemiologii i poznania potencjalnych środowiskowych rezerwuarów tego patogenu. W naturze zdolne do namnażania się pałeczki *H. pylori* wykrywane są wyłącznie w niszy kolonizacyjnej jaką jest błona śluzowa żołądka. Wysłunięto hipotezę zakładającą, że bakterie opuszczające swoje naturalne środowisko są narażone na szkodliwe czynniki chemiczne i fizyczne, które indukują powstanie form ziarniakowatych. Jeśli rzeczywiście formy kokoidalne umożliwiają bakteriom przetrwanie w niesprzyjających warunkach, to zmiany morfologiczne prowadzące do utworzenia tej postaci są procesem celowym, wymagającym nakładu energii. Jeśli tak, to konwersja morfologiczna powinna wymagać aktywnego procesu transkrypcji i translacji prowadzącego do utworzenia białek swoistych dla form kokoidalnych. Jednak, transformacji towarzyszy utrata zdolności wzrostu na podłożach bakteriologicznych, stąd w badaniach nad żywotnością form kokoidalnych stosuje się metody alternatywne, polegające na pośrednim wykazaniu żywotności bakterii na podstawie: procesu syntezy białek, zawartości i integralności kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) oraz rybonukleinowego (RNA), aktywności enzymatycznej, obecności swoistych antygenów lub kodujących je genów, zdolności do infekowania

zwierząt laboratoryjnych oraz wzbudzania odpowiedzi immunologicznej. Technika najczęściej stosowaną w identyfikacji form kokoidalnych jest metoda reakcji łańcuchowej polimerazy-PCR (polimeraze chain reaction) i jej modyfikacje. Genami swoistymi dla *H. pylori*, znajdującymi zastosowanie w detekcji tych bakterii są m.in. chromosomalna sekwencja 16S rRNA, geny kodujące podjednostki A i C ureazy oraz białka CagA i VacA [12,14,38,46,62].

Badania nad transformacją form morfologicznych *H. pylori* pozwoliły ustalić dynamikę powstawania form kokoidalnych. W zależności od typu hodowli (płynna, stała), składu podłoża oraz warunków hodowli, formy kokoidalne pojawiają się w różnym czasie. Sisto i wsp. wykazali, że formy ziarniakowate zachowują zdolność do wzrostu na podłożach płynnych nawet po 4-tygodniowej hodowli w temperaturze 37°C, w warunkach mikroaerofilnych. Ich żywotność została potwierdzona wzrostem na podłożach stałych oraz jego zahamowaniem pod wpływem erytromycyny zaburzającej syntezę białek i metronidazolu powodującego zmiany w DNA. Formy kokoidalne były natomiast odporne na amoksylicynę ingerującą w proces syntezy peptydoglikanu oraz podziały komórkowe. Udowodniono w ten sposób nie tylko żywotność form kokoidalnych, ale obecność niezdegradowanego RNA oraz DNA tych bakterii [62]. Wyniki uzyskane z użyciem ilościowej metody PCR połączonej ze znakowaniem monoazydkiem propidyny (PMA-qPCR) wskazują natomiast, że wraz ze wzrostem odsetka form kokoidalnych spada liczba żywych komórek bakteryjnych. Technika ta umożliwia ilościową ocenę kopii określonych genów wyłącznie w komórkach martwych, których błona komórkowa uległa dezintegracji [25].

Analiza porównawcza form spiralnych i ziarniakowatych pozwoliła na wskazanie cech charakterystycznych dla każdej z trzech podstawowych form morfologicznych *H. pylori* (tabela 1). Wang i wsp. wykazali, że genomy obu postaci zawierały niezmienną sekwencję kodującą białko CagA. Ponadto struktura DNA formy ziarniakowatej pozostawała nienaruszona, a zawartość kwasów nukleinowych porównywalna do tej, która jest obserwowana u postaci spiralnej. W przypadku obu form wykazano aktywny proces syntezy białek [67]. Podobne wyniki uzyskali Sisto i wsp., którzy wykazali, że nawet po 31-dniowej hodowli *H. pylori* zarówno DNA, jak i RNA form kokoidalnych pozostają nienaruszone, a geny dla ureazy i białka CagA nadal ulegają ekspresji [62]. Jednak analiza zawartości DNA w formach spiralnych, w porównaniu do kokoidalnych, ujawniła zauważalny spadek DNA odpowiednio z 2,5 kopii genomu/komórkę do 0,23-0,001 kopii przypadającej na jedną komórkę kokoidalną (w zależności od warunków hodowli) [48]. Zarówno ilościowa analiza zawartości kwasów nukleinowych, jak i klasyczna metoda PCR pozwalają na stwierdzenie obecności genomu lub genów bakteryjnych, jednak nie pozwalają na ocenę żywotności bakterii [44]. Okres półtrwania bakteryjnego mRNA wynosi 2-3 min. Po tym

czasie cząsteczki mRNA są degradowane przez enzymy wewnątrzkomórkowe. Stąd wykazanie obecności nienaruszonych transkryptów UreA, UreI, CagA oraz HspA, zarówno po 10 jak i 21 dniach hodowli na podłożu stałym sugeruje zachowanie aktywności metabolicznej form kokoidalnych. Inni autorzy wykazali obecność nieszkodzonych genów kodujących podjednostki UreA i białko CagA w formach kokoidalnych uzyskanych z 31-dniowej hodowli płynnej [46,62].

Analiza profilu antygenowego przeprowadzona z zastosowaniem elektroforezy SDS-PAGE i metody Trans blot ujawniła, że podczas konwersji do stanu kokoidalnego zmianie podlega ponad połowa antygenów *H. pylori*. Transformacji do formy ziarniakowatej towarzyszy ponadto utrata ekspresji poryn i adhezyn [8,39]. Mizoguchi i wsp. udowodnili związek między składem profilu białkowego form kokoidalnych a rodzajem czynnika użytego do indukcji procesu transformacji [45]. W zależności od czasu hodowli (20 lub 100 dni), pH środowiska (kwaśnego lub obojętnego) oraz podłoża (fizjologiczny roztwór soli lub woda destylowana) badacze uzyskiwali różne profile białkowe *H. pylori*. Co więcej, formy ziarniakowate po stu dniach przetrzymywania w wodzie destylowanej wykazały ekspresję białek na wyższym poziomie niż te inkubowane w fizjologicznym roztworze chlorku sodu [35,45]. Bumann i wsp. z użyciem elektroforezy dwukierunkowej przeprowadzili analizę porównawczą profili antygenowych dwóch postaci *H. pylori*. Spośród 1500 białek syntetyzowanych w obu typach morfologicznych wyselekcjonowano dwa nieulegające ekspresji w komórkach kokoidalnych: toksynę wakuolizującą VacA i proteinazę serynową HtrA. Autorzy sugerują, że białka wykrywane w formach kokoidalnych nie były identyczne z obecnymi w pałeczkach *H. pylori*. Uznano, że różnice te mogą świadczyć o zmianach potranslacyjnych zachodzących podczas konwersji [9]. Shahamat i wsp. badając reaktywność antygenów różnych form *H. pylori* z surowicami osób zakażonych tymi bakteriami dowiedli, że inkubacja powyższych surowic z antygenami form ziarniakowatych *H. pylori* nie pozwoliła na wyabsorbowanie przeciwciał, podczas gdy kompleksy antygen - przeciwciało powstawały w surowicach inkubowanych z mieszaninami antygenów pochodzących z form spiralnych. Powyższe wyniki wskazują na istnienie istotnych różnic w składzie antygenowym form ziarniakowatych i spiralnych *H. pylori* [60].

Ruchliwość *H. pylori* jest determinowana nie tylko przez helikalny kształt bakterii, ale także przez obecność rzęsek. Mimo obniżenia lub utraty ekspresji licznych białek, formy ziarniakowate są zaopatrzone w struktury determinujące adhezję i ruch. Badania She i wsp. z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały obecność rzęsek nie tylko u form pałeczkowatych, ale również na powierzchni komórek ziarniakowatych *H. pylori* [61]. Ponadto Couturier i wsp. zaobserwowali, że wraz z upływem czasu hodowli i zwiększającym się udziałem komórek kokoidalnych w populacji drobnoustrojów wzrasta liczba filamentów. Struktury te osiągają długość 59 µm

Tabela 1. Cechy charakterystyczne klasycznych i alternatywnych form *H. pylori*.

właściwości	forma spiralna	forma ziarniakowata	forma degeneratywna	źródło
podstawowe cechy				
morfologia	pałeczka, forma spiralna, S-kształtna	kulista	kulista	[2,4,6,7,8,13,19,37,41,45]
wzrost na podłożach hodowlanych	tak	brak	brak	[2,4,6,7,19,45,50,58,59]
występowanie	śluzowa błona żołądka i dwunastnicy	długotrwałe hodowle, niekorzystne warunki, biofilmy	długotrwałe hodowle niekorzystne warunki	[2,20,30,42,49,50,52,57]
skład antygenowy				
budowa błony zewnętrznej	ciągła, gładka struktura	ciągła, gładka struktura	pofałdowana powierzchnia, brak ciągotości	[6,37,59]
budowa błon wewnętrznych	zachowana	zachowana	brak	[6,59]
wytwarzanie ureazy	na wysokim poziomie	na niskim poziomie lub brak	brak	[62]
obecność rzęsek	obecne, ruchliwe	obecne, nieruchliwe	brak	[61]
obecność filamentów	nieliczne	bardzo liczne	brak	[20]
kwasy nukleinowe				
DNA	niezdegradowane, duża liczba kopii	niezdegradowane, spadek liczby kopii	fragmentacja, degradacja	[48]
RNA	stały, na wysokim poziomie	stały, niski	brak lub niski poziom	[62]
transkrypty UreA/B	obecne	obecne/brak (w zależności od czasu hodowli)	brak	[9,46]
transkrypty CagA	obecne	obecne	brak	[9,67]
transkrypty VacA	obecne	brak	brak	[8,9,62,67]
właściwości zakaźne				
adhezja do komórek nabłonkowych	wysoka	ograniczona	brak bądź bardzo niska	[14,15,18,39,55,61,65,68]
indukcja wytwarzania IL-8	wysoka	niska	b. d.	[15,16,17,18]
kolonizacja zwierząt laboratoryjnych	wysoka	niska	brak	[11,23,24,30,61,66]

Skróty: b. d.-brak danych; CagA-antygen związany z cytotosyną; DNA-kwas dezoksyrybonukleinowy; IL-interleukina; RNA-kwas rybonukleinowy; UreA/B-podjednostki ureazy; VacA-toksyna wakuolizująca

i powodują agregację form kokoidalnych. Molekularną podstawą efektu agregacji może być zmiana w ekspozowanych na powierzchni strukturach cukrowych [20]. Khin i wsp. wykazali zróżnicowaną intensywność agregacji form kokoidalnych *H. pylori* zależną od liczby wiązań cukrowych występujących w oligosacharydach ściany komórkowej, przy czym w interakcjach tych główną rolę odgrywały reszty fukozy, mannozy i N-acetyloglukozaminy [34].

WŁAŚCIWOŚCI ZAKAŻNE I IMMUNOMODULACYJNE FORM KOKOIDALNYCH *H. PYLORI*

Obecność pałeczek *H. pylori* w organizmie nie jest warunkiem wystarczającym do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej oraz wywołania zmian patologicznych. Niezbędna jest ekspresja czynników wirulencji m.in. ureazy, białek CagA i VacA oraz podstawowych adhezyn (BabA i SabA) umożliwiających przyleganie bakterii do komórek nabłonkowych żołądka i warunkujących interakcje z komórkami immunokompetentnymi gospodarza [16,17]. Formy kokoidalne nie wykazują ekspresji wielu antygenów, tj. VacA, niektórych adhezyn i poryn. Jednak wytwarzanie białka CagA, obecność rzęsek, filamentów oraz aktywność ureolityczna mogą wskazywać na zachowanie właściwości zakaźnych tych form drobnoustrojów [8,20,39]. Ponadto formy kokoidalne nie są wyłącznie izolowane z długoterminowych hodowli, ale także z bioptatów błony śluzowej żołądka osób zakażonych oraz zwierząt laboratoryjnych doświadczalnie zakażonych *H. pylori* [42,49].

Jednym z pierwszych etapów zakażenia jest adhezja bakterii do komórek gospodarza. Formy pałeczkowate dysponują różnorodnymi adhezynami umożliwiającymi ten proces [15,17]. Adhezyny obecne na powierzchni form kokoidalnych nie zostały jeszcze scharakteryzowane, jednak wiadomo, że ta postać bakterii wykazuje zdolność przylegania zarówno do powierzchni abiotycznych, jak i biotycznych [5,14,61,65,68]. Formy kokoidalne zachowują rzęski, aktywność ureolityczną oraz zdolność przylegania do komórek nabłonkowych. Stopień adhezji form kokoidalnych do komórek linii Hep-2 był dwukrotnie mniejszy w porównaniu do form pałeczkowatych, jednak ponad 30% komórek ziarniakowatych aktywnie przylegało do ich powierzchni [61]. Vijayakumari i wsp. potwierdzili przyleganie postaci kokoidalnych do komórek linii Kato III [65]. Badania z użyciem komórek nabłonkowych żołądka GES-1 wykazały, że formy kokoidalne mają zbliżone właściwości adhezji oraz ograniczoną zdolność do indukowania apoptozy, podczas gdy formy spiralne indukują zarówno apoptozę komórek nabłonkowych, jak i autofagię makrofagów [55,68]. Formy kokoidalne stymulowały limfocyty do wytwarzania IL-18 oraz surwiwiny, natomiast formy spiralne silniej wzbudzały ekspresję receptora TLR5 oraz wytwarzanie regulatorowej IL-17.

Jednym z głównych objawów aktywnego zakażenia *H. pylori* jest rekrutacja komórek odpornościowych do

błony śluzowej żołądka. W proces ten zaangażowany jest jeden z mediatorów wczesnej reakcji zapalnej - IL-8 [15,16,17]. Cole i wsp. porównali wytwarzanie IL-8 w odpowiedzi na formy spiralne i kokoidalne *H. pylori* [18]. Komórki nabłonkowe w obecności form kokoidalnych nie wydzielają IL-8 lub wytwarzały tę cytokinę na znacznie niższym poziomie niż w odpowiedzi na formy spiralne *H. pylori*. Natomiast w badaniach z użyciem linii komórek AGS wykazano, że formy kokoidalne indukowały wytwarzanie IL-8 i że proces ten był hamowany mutacją w genie *amiA* [68].

Jisong i wsp. wykazali, że po tygodniu od zakażenia myszy spiralnymi postaciami *H. pylori* w błonie śluzowej żołądka pojawiały się formy kokoidalne tej bakterii. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku bioptatów błon śluzowych żołądka osób z przewlekłym zakażeniem *H. pylori*. W celu zbadania, czy obecność form kokoidalnych jest spowodowana śmiercią komórek bakteryjnych, czy też są to w pełni zakaźne formy *H. pylori*, przeprowadzono badania na modelach zwierzęcych. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na gnotobiotycznych, sterylnych prosiętach (germ-free) wykluczyły zdolność zakażenia i wywoływania reakcji zapalnej przez kokoidalne formy *H. pylori* [23]. Kolonizację tkanek stwierdzono u wszystkich osobników w grupie zwierząt zakażonych formami spiralnymi i u żadnego zwierzęcia z grupy zakażanej formami ziarniakowatymi. Przeciwciała IgM i IgA anty-*H. pylori* wykryto wyłącznie w surowicach zwierząt zakażonych formami pałeczkowatymi *H. pylori*. Inokulum form kokoidalnych *H. pylori*, zastosowane do zakażenia prosiąt, zawierało prawie dwadzieścia razy więcej drobnoustrojów niż minimalna dawka form pałeczkowatych wywołująca objawy zakażenia, a mimo to nie stwierdzono kolonizacji tkanek gospodarza [23,24]. Badania przeprowadzone na modelu mysim przyniosły odmienne wyniki. Kolonizację tkanek i zapalenie błony śluzowej żołądka stwierdzono u wszystkich zwierząt zakażonych postacią pałeczkowatą oraz u połowy zwierząt zakażonych formami kokoidalnymi, przy czym forma ziarniakowata indukowała zapalenie o słabym nasileniu, podczas gdy pałeczki *H. pylori* wzbudzały ostrą reakcję zapalną [11,61]. Z badań Wanga i wsp. wynika, że formy kokoidalne podobnie jak spiralne mają zdolność zakażenia myszy BALB/c i wzbudzają ostrą reakcję zapalną [66]. Pomimo obniżonej aktywności form kokoidalnych *H. pylori* w zakresie wzbudzania stanu zapalnego, w ponad połowie (68,8%) próbek bioptatów błon śluzowych żołądka pobranych od myszy zakażonych formami ziarniakowatymi obserwowano kolonizację tkanek. Co więcej, z bioptatów żołądka pochodzących od zwierząt zakażonych formami kokoidalnymi izolowano postacie spiralne, co wskazywało na odwracalność procesu transformacji [66]. Wyniki badań Wanga i wsp. pozostają w zgodzie z obserwacjami She'a i wsp., którzy na 30 dni po zakażeniu myszy formami kokoidalnymi w bioptatach żołądka stwierdzili zmiany patologiczne błony śluzowej, tj. napływ komórek zapalnych oraz obecność form spiralnych [61].

Z przytoczonych badań wynika, że formy kokoidalne wykazują słabsze właściwości immunomodulacyjne. Zakładając, że postać kokoidalna jest pewnego rodzaju formą „spoczynkową” *H. pylori*, brak indukcji reakcji zapalnej potwierdza jedynie ich funkcję, która sprowadzałyby się jedynie do przetrwania w organizmie gospodarza.

BIOFILM *HELICOBACTER PYLORI*

Zgodnie z definicją, biofilm stanowi społeczność drobnoustrojów przytwierdzonych do powierzchni stałej (biotycznej lub abiotycznej), pokrytych zewnątrzkomórkową substancją polimerową tzw. EPS (extracellular polymer substance), komunikujących się za pomocą cząsteczek zewnątrzkomórkowych [57]. Podobnie jak większość drobnoustrojów patogennych, *H. pylori* wykazuje zdolność do tworzenia biofilmu [2,27,28,33,38,50,69]. Etapem rozpoczynającym formowanie tej struktury jest proces adhezji. Wykazano, że *H. pylori* ma zdolność przylegania nie tylko do powierzchni biotycznych (komórki Kato III, komórki GES-1), ale i abiotycznych (stal nierdzewna, szkło, polichlorek winylu) [5,61,67]. Aza-vedo i wsp. wykazali, że zarówno formy sferyczne, jak i pałeczki *H. pylori* przylegają do powierzchni abiotycznych, przy czym adhezja do szkła i polichloru winylu była silniejsza w porównaniu do powierzchni miedzianych czy żelaza [5]. Ocena dynamiki powstawania i analiza składu biofilmu *H. pylori* wymagała ustalenia specjalnego modelu badawczego polegającego na prowadzeniu hodowli w podłożu płynnym i generacji biofilmu na granicy faz. Wykazano, iż w składzie kilkudniowego biofilmu *H. pylori* początkowo dominowały formy spiralne następnie, po tygodniu struktura przyjmowała charakter mieszany (formy spiralne i ziarniakowate), a ostatecznie w dojrzałym, dwutygodniowym biofilmie występowały wyłącznie formy kokoidalne [2,69]. EPS wchodzący w skład biofilmu *H. pylori* zawiera głównie cząsteczki proteomannanu, a także silnie usieciowaną mannozę i alfa-(1,4)-glikan. Yang i wsp. sugerowali, że większość oligosacharydów biofilmu pochodzi z lipopolisacharydu *H. pylori* [69]. Ponadto w komórkach bakteryjnych budujących biofilm stwierdzono podwyższoną ekspresję białek syntetyzowanych w warunkach stresowych, w tym ureazy, białek Hsp60, peroksyreduktazy, ferrytyny i katalazy. Ci sami autorzy wykazali, że delekcja genów *luxS* i *cagE* wzmagala tworzenie biofilmu *H. pylori*. Natomiast usunięcie genu *napA* skutkowało zahamowaniem procesu adhezji i agregacji komórek, przez co utworzony biofilm stawał się mniej spójny [2,27]. Poza wielkocząsteczkowymi substancjami cukrowymi biofilm *H. pylori* zawiera zewnątrzkomórkowe cząsteczki DNA. Nie pełnią one jednak funkcji strukturalnych. Traktowanie biofilmu *H. pylori* DNA-azami nie prowadziło do obniżenia jego kondycji, struktury ani żywotności [27,28]. Podejrzewa się, że DNA może być uwalnianie przez formy kokoidalne w postaci pęcherzyków zewnątrz błonowych OMV (outer membrane vesicles). Zjawisko to może się przyczyniać do zwiększenia różnorodności genetycznej populacji [70]. Dowiedziono bowiem, że procesy transformacji, koniugacji lub uwalniania DNA pro-

wadzi do stabilizacji struktury populacyjnej i trwałości biofilmu [27]. Badania z użyciem dwóch różnych szczepów *H. pylori* pozwalają sugerować, że utworzone przez nie biofilmy mieszane były bardziej stabilne, wykazywały większe zróżnicowanie antygenowe oraz zawierały więcej EPS, w porównaniu do biofilmów wyprowadzonych z jednego szczepu bakterii. *H. pylori* mogą stanowić także element biofilmu wielogatunkowego tworzonego z udziałem takich bakterii jak: *Brevunolimonas* spp., *Mycobacterium chelonae*, *Sphingomonas* spp., *Legionella pneumophila* [12,26,63]. Wykazano również współistnienie *H. pylori* w strukturach zasiedlanych przez ameby z rodzaju *Acanthamoeba*. Udowodniono, że w obecności tych ostatnich, biofilm *H. pylori* tworzony był szybciej i skuteczniej, co pozwala sugerować, że ameby mogą stanowić potencjalny środowiskowy rezerwuuar *H. pylori*. Nie ma jednak danych świadczących o bezpośrednim wpływie obecności ameb na zwiększenie transmisji *H. pylori* [33].

Zdolność do tworzenia biofilmów jest właściwością wielu patogenów oportunistycznych i stanowi rodzaj czynnika patogenności, który ułatwia przetrwanie w niesprzyjającym środowisku, wymianę materiału genetycznego oraz wzmocnienie struktury populacyjnej bakterii. W kontekście przeżywalności *H. pylori* w postaci VBnC jak i biofilmu tworzonego na powierzchniach abiotycznych, woda pitna może być rozpatrywana jako potencjalny rezerwuuar tych bakterii i ważne zagrożenie epidemiologiczne przyczyniające się do rozprzestrzeniania *H. pylori* [1,10,32,47].

PODSUMOWANIE

Praca jest przeglądem aktualnych doniesień na temat różnorodności, żywotności i dynamiki powstawania form morfologicznych *H. pylori*. Jak dotąd, mimo znajomości dróg transmisji i rozprzestrzeniania się, a także rezerwuarów *H. pylori* nadal nie udokumentowano obecności żywych, w pełni zakaźnych form tych bakterii w wodzie pitnej, która od wielu lat jest rozpatrywana jako przypuszczalny rezerwuuar środowiskowy *H. pylori*. W ostatnich latach nastąpił jednak znaczny postęp w badaniach źródeł zakażenia *H. pylori*, z uwzględnieniem środowiska wodnego. Udział *H. pylori* w tworzeniu biofilmów oraz występowanie form VBnC należy uznać za ważne czynniki wirulencji, przyczyniające się do przeżycia i rozprzestrzeniania bakterii w środowisku. Formy kokoidalne typu VBnC są pozbawione części antygenów, jednak wykazują ekspresję licznych, istotnych czynników zakaźnych, które mogą wzbudzać reakcję zapalną oraz - zgodnie z badaniami przeprowadzonymi na modelach zwierzęcych, mogą wywoływać zmiany patologiczne w błonie śluzowej zwierząt, a także ulegać ponownej konwersji do pierwotnej formy pałeczkowatej. Odniesiono się do wyników badań poddających w wątpliwość oraz potwierdzających żywotność i zdolności zakaźne alternatywnych form morfologicznych *H. pylori*. Podsumowano prace analizujące różnice w profilach antygenowych dwóch podstawowych postaci *H. pylori*. Praca zaopatrzona jest w autorskie ryciny obrazujące koncepcje m.in. Andersena i Celliniego,

zgodnie z którą formy morfologiczne *H. pylori* stanowią poszczególne stadia rozwoju tych bakterii. Należy oczekiwać, iż dalsze badania wkrótce wskażą etap, na którym stadia te tracą żywotność i właściwości zakaźne, a także

wyjaśnią czy ich przeżywanie w wodzie pitnej w formie VBnC oraz biofilmach środowiskowych stanowi zagrożenie epidemiologiczne i przyczynia się do rozprzestrzeniania *H. pylori*.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahmed K.S., Khan A.A., Ahmed I., Tiwari S.K., Habeeb A., Ahi J.D., Abid Z., Ahmed N., Habibullah C.M.: Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a South Indian perspective. *Singapore Med. J.*, 2007; 48: 543-549
- [2] Andersen L.P., Rasmussen L.: *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2009; 56: 112-115
- [3] Anonymous: Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum., 1994; 61: 1-241
- [4] Azevedo N.F., Almeida C., Cerqueira L., Dias S., Keevil C.W., Vieira M.J.: Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 3423-3427
- [5] Azevedo N.F., Pacheco A.P., Keevil C.W., Vieira M.J.: Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *J. Appl. Microbiol.*, 2006; 101: 718-724
- [6] Benaissa M., Babin P., Quellard N., Pezennec L., Cenatiempo Y., Fauchere J.L.: Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 2331-2335
- [7] Bode G., Mauch F., Malferttheiner P.: The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.*, 1993; 111: 483-490
- [8] Bumann D., Aksu S., Wendland M., Janek K., Zimny-Arndt U., Sabarth N., Meyer T.F., Jungblut P.R.: Proteome analysis of secreted proteins of the gastrin pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 3396-3403
- [9] Bumann D., Habibi H., Kan B., Schmid M., Goosmann C., Brinkmann V., Meyer T.F., Jungblut P.R.: Lack of stage-specific proteins in coccoid *Helicobacter pylori* cells. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 6738-6742
- [10] Cave D.R.: How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology*, 1997; 113: S9-S14
- [11] Cellini L., Allocati N., Angelucci D., Lezzi T., Di Campli E., Marzio L., Dainelli B.: Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable *in vitro* reverts in mice. *Microbiol. Immunol.*, 1994; 38: 843-850
- [12] Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Di Giulio M., Traini T., Trubiani O.: Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. *J. Appl. Microbiol.*, 2008; 105: 761-769
- [13] Cellini L., Robuffo I., Maraldi N.M., Donelli G.: Searching the point of no return in *Helicobacter pylori* life: necrosis and/or programmed cell death? *J. Appl. Microbiol.*, 2001; 90: 727-732
- [14] Chaput C., Ecobichon C., Cayet N., Girardin S.E., Werts C., Guadagnini S., Prevost M.C., Mengin-Lecreux D., Labigne A., Boneca I.G.: Role of *amiA* in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape. *PLoS Pathog.*, 2006; 2: e97
- [15] Chmiela M., Czkwianiec E., Wadstrom T., Rudnicka W.: Role of *Helicobacter pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages. *Gut*, 1997; 40: 20-24
- [16] Chmiela M., Michetti P.: Inflammation, immunity, vaccines for *Helicobacter* infection. *Helicobacter*, 2006; 11 (Suppl. 1): 21-26
- [17] Chmiela M., Wiśniewska M., Bąk-Romaniszyn L., Rechciński T., Planeta-Malecka I., Bielański W., Konturek S.J., Płonka M., Klink M., Rudnicka W.: Serological differentiation of *Helicobacter pylori* CagA(+) and CagA(-) infections. *Arch. Immunol. Exp. Ther.*, 2003; 51: 131-136
- [18] Cole S.P., Cirillo D., Kagnoff M.F., Guiney D. G., Eckmann L.: Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 843-846
- [19] Costa K., Bacher G., Allmaier G., Dominguez-Bello M.G., Engstrand L., Falk P., De Pedro M., Garcia Del Portillo F.: The morphological transition of *Helicobacter* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 3710-3715
- [20] Couturier M.R., Stein M.: *Helicobacter pylori* produces unique filaments upon host contact *in vitro*. *Can. J. Microbiol.*, 2008; 54: 537-548
- [21] Cover T., Blaser M.J.: *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, 2009; 136: 1863-1873
- [22] Dworkin J.: Form equals function? Bacterial shape and its consequences for pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 2010; 78: 792-795
- [23] Eaton K.A., Catrenich C.E., Makin K.M., Krakowka S.: Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J. Infect. Dis.*, 1995; 171: 459-462
- [24] Figueroa G., Faundez G., Troncoso M., Navarrete P., Toledo M.S.: Immunoglobulin G antibody response to infection with coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002; 9: 1067-1071
- [25] Gemma A., Codony F., Fittipaldi M., Adrados B., Morato J.: Viability determination of *Helicobacter pylori* using propidium monoazide quantitative PCR. *Helicobacter*, 2010; 15: 473-476
- [26] Gão M.S., Azevedo N.F., Wilks S.A., Vieira M.J., Keevil C.W.: Interaction of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori* with bacterial species isolated from drinking water biofilms. *BMC Microbiol.*, 2011; 11: 57
- [27] Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Verginelli F., Di Giulio M., Baffoni M., Bessa L.J., Cellini L.: *Helicobacter pylori* biofilm: a protective environment for bacterial recombination. *J. Appl. Microbiol.*, 2012; 113: 669-676
- [28] Grande R., Di Giulio M., Bessa L.J., Di Campli E., Baffoni M., Guarneri S., Cellini L.: Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumor. *J. Appl. Microbiol.*, 2010; 110: 490-498
- [29] Grębowska A., Moran A.P., Bielański W., Matusiak A., Rechciński T., Rudnicka K., Baranowska A., Rudnicka W., Chmiela M.: *H. pylori* lipopolysaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocytes cultures. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010; 61: 437-442
- [30] Jiesong H., Ho B., Zheng P., Yeoh K.G., Ng H.C., Lim S.G.: Coexistence of *Helicobacter pylori* spiral and coccoid forms in experimental mice. *World J. Gastroenterol.*, 1998; 4: 485-488
- [31] Joseleau-Petit D., Liebart J.C., Ayala J.A., D'Ari R.: Unstable *Escherichia coli* L-forms revisited: growth requires peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 6512-6520
- [32] Karita M., Teramukai S., Matsumoto S.: Risk of *Helicobacter pylori* transmission from drinking well water is higher than that from infected intrafamilial members in Japan. *Dis. Dig. Sci.*, 2003; 48: 1062-1067
- [33] Kawaguchi K., Matsuo J., Osaki T., Kamiya S., Yamaguchi H.: Prevalence of *Helicobacter* and *Acanthamoeba* in natural environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009; 48: 465-471
- [34] Khin M.M., Hua J.S., Ng H.C., Wadstrom T., Bow H.: Agglutination of *Helicobacter pylori* coccoids by lectins. *World J. Gastroenterol.*, 2000; 6: 202-209

- [35] Konishi K., Sato N., Shoji E., Takeda H., Kato M., Asaka M., Ooi H.K.: *Helicobacter pylori*: longer survival in deep ground water and sea water than in a nutrient-rich environment. *APMIS*, 2007; 115: 1285-1291
- [36] Kurokawa M., Nukina N., Nakanishi H., Tomita S., Tamura T., Shimoyama T.: Resuscitation from viable but nonculturable state of *Helicobacter pylori*. *Kansenshogaku Zasshi*, 1999; 73: 15-19
- [37] Kusters J.G., Gerrits M.M., Van Strijp J.A., Vandenbroucke-Grauls C.M.: Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 3672-3679
- [38] Linke S., Lenz J., Gemein S., Exner M., Gebel J.: Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2010; 213: 176-182
- [39] Liu Z.F., Chen C.Y., Tang W., Zhang J.Y., Gong Y.Q., Jia J.H.: Gene-expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.*, 2006; 55: 1009-1015
- [40] Łaszewicz W.: Wyniki badań nad zakażeniem *Helicobacter pylori*. Klinika Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Białymstoku, Trans Humana, Białystok, 2004
- [41] Marshall, B.J., Warren, J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984; 16: 1311-1315
- [42] Metzger J., Styger S., Sieber C., Von Flue M., Vogelbach P., Harder F.: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer perforations. *Swiss Med. Wkly*, 2001; 131: 99-103
- [43] Miszczyk E., Rudnicka K., Moran A.P., Fol M., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Matusiak A., Walencka M., Rudnicka W., Chmiela M.: Interaction of *Helicobacter pylori* with C-type lectin dendritic cell-specific ICAM grabbing nonintegrin. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012; 2012: 206463
- [44] Mitsushige S., Wu J.Y., Abudayyeh S., Hoffman J., Brahem H., AL-Khatib K., Yamaoka Y., Graham D.Y.: Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples, 2009; 47: 738-742
- [45] Mizoguchi H., Fujioka T., Nasu M.: Evidence for viability of coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol.*, 1999; 34, Suppl. 11: 32-36
- [46] Monstein H. J., Jonasson J.: Differential virulence-gene mRNA expression in coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 285: 530-536
- [47] Moreno Y., Piqueres P., Alonso J.L., Jiménez A., González A., Ferrús M.A.: Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res.*, 2007; 41: 3490-3496
- [48] Narikawa S., Kawai S., Aoshima H., Kawamata O., Kawaguchi R., Hikiji K., Kato M., Ino S., Mizushima Y.: Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997; 4: 285-290
- [49] Ng B.L., Quak S.H., Aw M., Goh K.T., Ho B.: Immune responses to differential forms of *Helicobacter pylori* in children with epigastric pain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003; 10: 866-869
- [50] Oliver J.D.: Recent findings on the viable but non culturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010; 34: 415-425
- [51] O'Toole P.W., Clyne M.: Physiology and Genetics. Cell envelope of *Helicobacter pylori*. Mobley H.L.T., Mendz G.L., Hazell S.L. (red.), ASM Press. Washington, 2001
- [52] Richards C.L., Brittany J.B., Ford T.E., Broadway S.C., Pyle B.H., Camper A.K.: Optimizing the growth of stressed *Helicobacter pylori*. *J. Microbiol. Methods.*, 2011; 84: 174-182
- [53] Roe I.H., Son S.H., Oh H.T., Choi J., Shin J.H., Lee J.H., Hah Y.C.: Changes in the evolution of the antigenic profiles and morphology during coccoid conversion of *Helicobacter pylori*. *Korean J. Intern. Med.*, 1999; 14: 9-14
- [54] Rudnicka K., Grębowska A., Moran A.P., Matusiak A., Walencka M., Miszczyk E., Bąk-Romaniszyn L., Czkwianiec E., Planeta-Malecka I., Rudnicka W., Chmiela M.: Odmienność skuteczności lipopolisacharydów *Helicobacter pylori* różniących się ekspresją determinantów antygenowych Lewis^{xy} w pobudzeniu leukocytów jednojądrzastych krwi obwodowej do wydzielania cytokin prozapalnych: IL-8 i TNF- α . *Prz. Gastroenterol.*, 2011; 6: 401-408
- [55] Rudnicka K., Szczęśna E., Miszczyk E., Mikołajczyk-Chmiela M.: Apoptoza i autofagia-mechanizmy i metody detekcji. *Postępy Biol. Komórki*, 2011; 38: 247-265
- [56] Rudnicka K., Włodarczyk M., Moran A.P., Rechciński T., Miszczyk E., Matusiak A., Szczęśna E., Walencka M., Rudnicka W., Chmiela M.: *Helicobacter pylori* antigens as potential modulators of lymphocytes' cytotoxic activity. *Microbiol. Immunol.*, 2012; 56: 62-75
- [57] Sadowska B., Walencka E., Więckowska-Szakiel M., Różalska B.: Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.*, 2010; 55: 497-501
- [58] Saito N., Konishi K., Sato F., Kato M., Takeda H., Sugiyama T., Asaka M.: Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J. Infect.*, 2003; 46: 49-55
- [59] Sato F., Saito N., Konishi K., Shoji E., Kato M., Takeda H., Sugiyama T., Asaka M.: Ultrastructural observation of *Helicobacter pylori* in glucose-supplemented culture media. *J. Med. Microbiol.*, 2003; 52: 675-679
- [60] Shahamat M., Alem N., Asalkhou M., Hamed N., Alem N., Morshedizadeh K., Alem M.: IgM antibody response to antigens prepared from vegetative and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Exp. Mol. Pathol.*, 2006; 81: 171-175
- [61] She F.F., Liu J.Y., Huang C., Su D.H.: Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 516-520
- [62] Sisto F., Brenciaglia M I., Scaltrito M.M., Dubini F.: *Helicobacter pylori*: ureA, cagA and vacA expression during conversion to the coccoid form. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000; 15: 277-282
- [63] Twing K.I., Kirchman D.L., Campbell B.J.: Temporal study of *Helicobacter pylori* presence in coastal freshwater, estuary and marine waters. *Water Res.*, 2010; 45: 1897-1905
- [64] Van Duynhoven Y.T., de Jonge R.: Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? *WHO Bull.*, 2001; 79: 455-460
- [65] Vijayakumari S., Khin M.M., Jiang B., Ho B.: The pathogenic role of the coccoid form of *Helicobacter pylori*. *Cytobios.*, 1995; 82: 251-260
- [66] Wang K.X., Li C.P., Cui Y.B., Tian Y., Yang Q.G.: L-forms of *H. pylori*. *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 525-528
- [67] Wang X., Willén R., Svensson M., Ljungh A., Wadström T.: Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS*, 2003; 111: 514-522
- [68] Williams J.C., McInnis K.A., Testerman T.L.: Adherence of *Helicobacter* to abiotic surfaces is influenced by serum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008; 74: 1255-1258
- [69] Yang F.L., Hassanbhai A.M., Chen H.Y., Huang Z.Y., Lin T.L., Wu S.H., Ho B.: Proteomannans in biofilm of *Helicobacter pylori* ATCC 43504. *Helicobacter*, 2011; 16: 89-98
- [70] Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., Fukuda M., Kawakami H., Ochiai K., Hanawa T., Kamiya S.: Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.*, 2009; 15: 197-209

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.