

Streszczenie

w języku polskim

Pałeczki *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) są głównym czynnikiem etiologicznym zapalenia błony śluzowej żołądka, dwunastnicy, wrzodów tych narządów oraz raka żołądka. Objawem szczególnym takich zakażeń jest patologiczna reakcja zapalna z naciekiem leukocytarnym, w skład którego wchodzi neutrofile, makrofagi (MØ), komórki tuczne i dendrytyczne oraz różne subpopulacje limfocytów, w tym komórki naturalnie cytotoksyczne NK (natural killer). Przewlekły charakter zakażeń *H. pylori* i ich zróżnicowany przebieg wskazują, że bakterie te posiadają zdolność modulowania procesów odpornościowych gospodarza. Wykazano, że w modulowaniu odporności adaptacyjnej swoistej ważną rolę odgrywają m.in. białko CagA i toksyna wakuolizująca VacA.

Pierwsza linia obrony gospodarza, na którą składają się monocyty, MØ, a także komórki NK jest prawdopodobnie kluczowa dla powstrzymania rozwoju zakażenia. Ich funkcjonowanie jest związane ze zdolnością rozpoznawania wzorców molekularnych czynników zakaźnych, do których należy m.in. lipopolisacharyd (LPS) bakterii Gram-ujemnych. Ten składnik ściany komórkowej pałeczek *H. pylori* jest słabo immunogenny, ze względu na budowę lipidu A, ale wpływ na jego aktywność mogą wywierać także determinanty antygenowe Lewis (Le)^{XY}, występujące w łańcuchach-O swoistych LPS większości szczepów *H. pylori*.

Kluczowe znaczenie komórek odporności wrodzonej w kontroli zakażeń oraz dotychczasowa wiedza na temat właściwości immunogennych antygenów *H. pylori*, stały się przesłanką do sformułowania hipotezy, że aktywność takich komórek może być modulowana przez antygeny *H. pylori* w organizmie gospodarza. Dominacja antygenów negatywnie modulujących aktywność komórek odpornościowych może skutkować utrwaleniem zakażenia i rozwojem reakcji patologicznych.

Za cel pracy obrano określenie właściwości immunomodulatorowych antygenów powierzchniowych *H. pylori*, głównie białkowych, zawartych w ekstrakcie glicynowym tych bakterii oraz LPS z ekspresją determinantów antygenowych Le^{XY}. Położono nacisk na zbadanie humoralnych i komórkowych reakcji cytotoksycznych, które mogłyby skutkować ograniczeniem kontroli komórek odpornościowych nad przebiegiem zakażenia i jego konsekwencjami. Ponieważ MØ są tarczą dla LPS, oceniono rolę tych komórek, eksponowanych na LPS *H. pylori* lub wzorcowy LPS *E. coli*, w pobudzaniu aktywności leukocytów krwi obwodowej dawców zakażonych (Hp+) lub niezakażonych *H. pylori* (Hp-), wrażliwych na LPS, w zakresie wytwarzania cytokin prozapalnych: TNF- α (tumor necrosis factor α) oraz interleukiny (IL)-8 i pobudzania ekspansji limfocytów T.

Wykazano, że LPS *H. pylori* typu Le^{XY} zaburzał dojrzewanie MØ i indukował zmiany o charakterze apoptozy w komórkach limfocytów, co skutkowało zahamowaniem ich aktywności proliferacyjnej. Wykluczono bezpośrednie działanie cytotoksyczne LPS na leukocyty, jako przyczynę zahamowania proliferacji limfocytów.

Ponadto, wykazano znaczenie determinantów antygenowych Le^{XY} w LPS *H. pylori*, w pobudzaniu monocytów krwi obwodowej dawców Hp+ i Hp-, do wytwarzania cytokin prozapalnych: TNF- α i IL-8.

Wyniki badań pozwalają sugerować, że uwalnianie LPS *H. pylori* typu Le^{XY} w miejscu zasiedlenia bakterii, w nabłonku żołądka, może skutkować indukcją zarówno miejscowej, jak i uogólnionej reakcji zapalnej, ale także modulacją aktywności napływających do niszy zapalnej komórek.

Badania nad aktywnością cytotoksyczną komórek NK krwi obwodowej dawców obu grup wykazały, że naturalna aktywność cytotoksyczna komórek NK osób Hp+ była słabsza niż osób Hp-. Wykazano, że może to być uwarunkowane dominacją komórek NK o fenotypie CD56^{bright}, o słabych właściwościach cytotoksycznych u dawców Hp+, a także wpływem regulatorowej IL-10. Surowicze stężenie tej cytokiny było wyższe u dawców Hp+ niż dawców Hp -.

Wykazano, że antygeny *H. pylori* mogą odmiennie regulować aktywność cytotoksyczną i sekrecyjną komórek NK. Komponenty białkowe *H. pylori* zawarte w ekstrakcie glicynowym pobudzały ekspansję komórek NK z ekspresją receptora dla IL-2 (CD25) o fenotypie CD3-CD56⁺CD25⁺. Komórki takie wykazywały aktywność cytotoksyczną wobec docelowych komórek nabłonkowych linii HeLa, zależną od wytwarzania IL-2 i IFN- γ . Natomiast słaba aktywność cytotoksyczna leukocytów w środowisku LPS *H. pylori* była związana z brakiem ekspansji komórek NK o fenotypie CD3-CD56⁺CD25⁺ zdolnych do wytwarzania IL-2 i IFN- γ , a nasileniem ekspansji komórek wydzielających IL-10, negatywnie regulującą aktywność komórek NK.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że dominacja w środowisku reakcji zapalnej antygenów *H. pylori* hamujących aktywność i /lub dojrzewanie komórek odporności wrodzonej takich jak monocyty i komórki NK oraz komórek odporności adaptacyjnej swoistej może sprzyjać rozwojowi przewlekłego zakażenia i zmian patologicznych.

Streszczenie

w języku angielskim

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative bacterium which is a major causative agent of chronic gastritis, gastric and peptic ulcers and stomach cancer. *H. pylori* infection is associated with a pathological inflammation accompanied by the gastric mucus layer infiltration with neutrophils, macrophages (MØ), mast and dendritic cells, as well as various subpopulations of lymphocytes, including NK (natural killer) cells. The chronic character of *H. pylori* infection and variations in clinical symptoms of infection indicate that these bacteria possess an ability to modulate the immune reactions of the host. It was shown that cytotoxin associated gene A (CagA) as well as vacuolating toxin VacA play an important role in the modulation of specific, adaptive responses.

The first line of host defense depends on the activity of monocytes, MØ and NK cells, which is probably crucial for the limitation of the *H. pylori* invasion. Their activity is associated with the ability to recognize molecular patterns of infectious agents such as lipopolysaccharides (LPS) of gram-negative bacteria. This component of the *H. pylori* cell wall has weak immunogenic properties, probably due to the lipid A structure, however the presence of Lewis antigens (Le^{XY}), expressed by the majority of *H. pylori* strains, in the structure of O-chain may also influence its downregulatory properties.

The importance of innate immune cells in the infection control, as well as recent knowledge on the immunogenic properties of *H. pylori* antigens was a premise to built a hypothesis that the activity of such cells might be modulated by *H. pylori* antigens in the host. The domination of *H. pylori*-dependent modulation of immune cells may lead to the persistence of infection and the development of pathological reactions.

The aim of this study was to evaluate immunomodulatory properties of the surface antigens of *H. pylori*, mainly the protein-derived glycine acid extract of this bacterium (EG) and the LPS with the expression of Le^{XY}. The study was focused on the evaluation of *H. pylori*-dependent humoral and cellular cytotoxic reactions, which may lead to the impairment of the immune control of *H. pylori* infection.

Since, MØ are a target for bacterial LPS, the role of these cells exposed to LPS *H. pylori* or standard *E. coli* LPS was evaluated in the context of their ability to stimulate peripheral blood leukocyte fractions from *H. pylori* infected (Hp+), and uninfected (Hp-) donors, susceptible to LPS.

We showed that *H. pylori* LPS of the Le^{XY} type impaired the maturation of MØ, and induced apoptotic changes in lymphocytes, which resulted in the inhibition of the proliferative response. The direct toxic activity of LPS, as a reason for disabled maturation was rather excluded.

We also showed the importance of Le^{XY} antigens of LPS *H. pylori*, in the stimulation of peripheral blood monocytes of Hp+ and Hp- individuals, to produce proinflammatory cytokines: tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin (IL)-8.

The release of *H. pylori* LPS Le^{XY} in the infectious niche, in the gastric epithelium may result in the induction of local and systemic inflammatory response, but also in the modulation of immune cells recruited to the site of infection.

We showed, for the first time, that the NK cells of Hp+ individuals have a weaker cytotoxic activity than the cells of Hp- donors. We further explained that this phenomenon in Hp+ donors may be a result of the domination of CD56^{bright} phenotype with a weak cytotoxic, and strong regulatory activity. This was also related to higher serum IL-10 concentrations in Hp+ donors.

Furthermore, we showed that the antigens of *H. pylori* might modulate the cytotoxic activity of NK cells in a different manner, depending on the antigen used for stimulation. The protein components of *H. pylori* EG stimulated the expansion of NK cells (CD3-CD56⁺CD25⁺) with the expression of IL-2R (CD25). Those cells expressed the cytotoxic activity towards Hela target cells, which was IL-2 and interferon γ (IFN- γ)-dependent. However, a weak cytotoxic activity in the *milieu* of *H. pylori* LPS was associated with the lack of NK cells of the CD3-CD56⁺CD25⁺ phenotype able to produce IL-2 i IFN- γ , as well as with the expansion of IL-10 producing cells negatively modulating the properties of NK activity.

The results obtained in this study showed that the domination of *H. pylori* antigens downregulating the activity and/or maturation of the innate cells, such as monocytes and NK cells or the cells of adaptive specific responses, may facilitate the persistence of infection and the development of *H. pylori*-related pathological processes.