

Pałeczki *H. pylori* są głównym czynnikiem etiologicznym zapalenia błony śluzowej żołądka u ludzi, które może prowadzić do rozwoju wrzodów żołądka lub dwunastnicy, a nawet raka żołądka. Przypuszcza się, że przewlekły stan zapalny podczas zakażeń *H. pylori* zaburza równowagę pomiędzy procesami śmierci komórkowej a proliferacją komórek błony śluzowej żołądka. Modulacja aktywności komórek śluzówki żołądka, a także komórek immunokompetentnych niewątpliwie wpływa na rozwój procesów odpornościowych gospodarza. Wiedza na temat roli komponentów *H. pylori* w destabilizacji bariery nabłonkowej żołądka oraz ich właściwości immunomodulacyjnych jest niewystarczająca. Jej pogłębianie jest niezbędne do zrozumienia patogenezy zakażeń *H. pylori*, ich zróżnicowanego przebiegu, poszukiwania odpowiednich wyznaczników reakcji zapalnej i odpornościowej, opracowania skutecznych metod zaawansowanej diagnostyki, leczenia oraz immunoprofilaktyki takich zakażeń.

Celem pracy była ocena skutków oddziaływania antygenów powierzchniowych *H. pylori* zawartych w ekstrakcie glicynowym (EG), lipopolisacharydu (LPS), białka CagA w formie rozpuszczalnej oraz immunogennej podjednostki UreA ureazy, na liniowe komórki nabłonkowe żołądka oraz fibroblasty, stanowiące odpowiedniki komórek błony śluzowej żołądka, a także komórki immunokompetentne odpowiedzi wrodzonej (monocyty/ makrofagi) i swoistej (limfocyty). Założono, że skutki oddziaływania komponentów *H. pylori* na komórki gospodarza zależą od rodzaju antygeny, jego stężenia, mechanizmu działania, typu komórek docelowych oraz czasu ich ekspozycji na dany antygen.

Wykazano, że antygeny EG, CagA i UreA (w wybranych doświadczalnie stężeniach, z uwzględnieniem wyników wcześniejszych badań własnych zespołu) nasilały proces migracji i proliferację komórek nabłonkowych żołądka oraz fibroblastów, przyczyniając się do naprawy uszkodzenia monowarstwy komórkowej w teście gojenia rany. Natomiast w przypadku LPS *H. pylori* proces gojenia był zależny od jego stężenia i typu komórek docelowych. W niskim stężeniu (1 ng/ml) LPS *H. pylori* nasilał migrację i proliferację komórek nabłonkowych żołądka, ale nie fibroblastów. Z kolei oba typy komórek traciły zdolność migracji i proliferacji po ekspozycji na wyższe stężenie LPS *H. pylori* (25 ng/ml). Obserwowana dysfunkcja komórek w odpowiedzi na wyższe stężenie LPS *H. pylori* była związana z uszkodzeniem ich DNA, zatrzymaniem cyklu komórkowego komórek nabłonkowych (w fazie S) i fibroblastów (w fazie G₂) oraz zmianami nekrotycznymi. Ponadto w hodowlach komórkowych traktowanych wysoką

dawką LPS *H. pylori* wykazano obniżone stężenie naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF), a także ufosforylowanej formy białka STAT3 w porównaniu do hodowli kontrolnych, co może tłumaczyć niezdolność komórek do zablźniania uszkodzenia.

W pracy założono, że *in vivo* przerwanie spójności bariery nabłonkowej żołądka może skutkować penetracją antygenów *H. pylori* do blaszki właściwej i ich oddziaływaniem z komórkami immunokompetentnymi. Makrofagi stanowią pierwszą linię obrony przed czynnikami zakaźnymi, i jako komórki prezentujące antygeny (APC) limfocytom T oraz poprzez wytwarzanie cytokin przyczyniają się do rozwoju odpowiedzi swoistej. Bakteryjny LPS może oddziaływać z komórkami gospodarza poprzez lipid A, uruchamiając ścieżki sygnałowe zależne od receptorów Toll-podobnych (TLR). Jednak ze względu na występowanie w LPS *H. pylori* reszt cukrowych (determinantów Lewis), interakcje

z komórkami gospodarza mogą odbywać się także za pośrednictwem receptorów lektynowych. W pracy wykazano, że LPS *H. pylori* wiąże się z receptorami lektynowymi typu DC-SIGN w formie rozpuszczalnej oraz zlokalizowanymi na powierzchni komórek linii monocytarno-makrofagowej THP-1. Swoistość wiązania LPS *H. pylori* typu Lewis^{xy} z receptorami DC-SIGN jest determinowana przez reszty fukozy, a w przypadku LPS *H. pylori* bez determinantów Lewis - przez reszty galaktozy.

Przewlekły charakter zakażeń *H. pylori* pozwala sugerować, że aktywność komórek układu odpornościowego gospodarza może być negatywnie modulowana przez antygeny *H. pylori*. Ze względu na nieznaną moment zakażenia *H. pylori* u ludzi, a tym samym czas jego trwania, badania dotyczące rozwoju procesów odpornościowych oparto na modelu doświadczalnego zakażenia tymi bakteriami u kawii domowych (potocznie świnek morskich). Wykazano, że 28-dniowe zakażenie *H. pylori* u tych zwierząt skutkowało rozwojem przewlekłej miejscowej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka. Limfocyty antygenowo swoiste zdolne do proliferacji w odpowiedzi na stymulację antygenami EG *H. pylori* w hodowlach *in vitro* wykryto w lokalnych węzłach krezkowych, ale nie w krwi obwodowej. W hodowlach limfocytów węzłów krezkowych zwierząt zakażonych *H. pylori*, ulegających ekspansji w odpowiedzi na EG, dominowały limfocyty T o fenotypie CD4⁺. Limfocyty T są głównymi producentami interferonu (IFN)- γ , będącego wyznacznikiem rozwoju odpowiedzi komórkowej. W przeprowadzonych badaniach, podwyższone stężenie tej cytokiny wykryto w hodowlach limfocytów proliferujących w odpowiedzi na białko CagA *H. pylori*. W tych hodowlach aktywność

IFN- γ nie była negatywnie regulowana przez transformujący czynnik wzrostowy (TGF- β), wytwarzany przez komórki immunokompetentne znajdujące się w takich hodowlach. Z kolei tylko we frakcji komórek monocytarno-makrofagowych pochodzących od zwierząt niezakażonych *H. pylori* wykryto ekspresję prozapalnej IL-1 β . Nie można zatem wykluczyć, że ekspresja tej cytokiny jest negatywnie modulowana podczas zakażenia *H. pylori*.

We wcześniejszych badaniach prowadzonych na ludzkich leukocytach krwi obwodowej dawców niezakażonych lub zakażonych *H. pylori* wykazano, że zarówno rozpuszczalne białko CagA, jak i LPS *H. pylori* hamowały ekspansję limfocytów, co pozostawało w związku z indukcją apoptozy limfocytów, a także z zaburzeniem zdolności makrofagów do prezentacji antygenów limfocytom. Na modelu kawii domowych z utrwalonym zakażeniem *H. pylori* potwierdzono hamowanie ekspansji limfocytów przez LPS tych bakterii. Jedną z możliwych przyczyn zahamowania odpowiedzi blastycznej limfocytów w odpowiedzi na LPS *H. pylori* mogła być niezdolność makrofagów do prezentacji antygenów. Dysfunkcja makrofagów była powiązana z uszkodzeniem ich DNA, podwyższonym stężeniem TGF- β oraz obniżonym stężeniem IFN- γ w hodowlach komórkowych.

Wyniki uzyskane w pracy wskazują na możliwą rolę antygenów *H. pylori* w zaburzeniu homeostazy komórek błony śluzowej żołądka, co *in vivo* może skutkować ich przenikaniem do blaszki właściwej oraz oddziaływaniem z komórkami immunokompetentnymi. Wykazano, że pewne antygeny *H. pylori*, tj. EG, CagA, UreA nasilają aktywność proliferacyjną komórek nabłonkowych żołądka i fibroblastów, co może być znaczące dla pobudzania procesów naprawczych. Jednakże nasilone podziały komórkowe mogą także sprzyjać mutacjom potencjalnie nowotworowym. Z kolei LPS *H. pylori* (25 ng/ml) hamował proces migracji i aktywność proliferacją komórek bariery śluzowej żołądka, co *in vivo* może skutkować ograniczeniem procesów naprawczych i utrwaleniem reakcji zapalnej. Natomiast hamowanie aktywności makrofagów, jako komórek APC, należy uznać za prawdopodobny mechanizm pałeczek *H. pylori* ograniczający rozwój odpowiedzi swoistej, celem utrwalenia zakażenia.

Małgorzata Eliza

H. pylori bacteria are the main etiological agent of gastritis in humans, which can lead to the development of gastric or duodenal ulcers, and even stomach cancers. It is believed that chronic inflammation during *H. pylori* infections affects the balance between cell death and proliferation of gastric mucosal cells. Modulation of the activity of gastric mucosal cells as well as immunocompetent cells may affect the development of host immune processes. Knowledge concerning the role of *H. pylori* components in the destabilization of the gastric epithelial barrier and their immunomodulatory properties is insufficient. It is necessary to deepen the understanding of the pathogenesis of *H. pylori* infections, as well as their different course and to search for appropriate markers of inflammation and immune response. Moreover, the development of advanced diagnostic methods, as well as treatment protocols and immunoprophylaxis are of great importance.

The aim of this study was to analyse the effects of *H. pylori* surface antigens of glycine acid extract (GE), lipopolysaccharide (LPS), soluble CagA protein and an immunogenic subunit A of urease (UreA) on the gastric epithelial cell line and fibroblasts, mimicking the gastric mucosa as well as on immune cells of innate (monocytes/macrophages) and adaptive (lymphocytes) immunity. It was assumed that the influence of *H. pylori* components on host cells depends on the type of antigen, its concentration, mechanism of action, the type of target cells and the time of cell exposure to the antigen.

It has been shown that EG, CagA and UreA (used in selected experimental concentrations, derived from previous studies) intensified the migration and proliferation of gastric epithelial cells and fibroblasts, followed by wound healing in a scratch assay. The healing process in response to *H. pylori* LPS was dependent on its concentration and the type of target cells. *H. pylori* LPS in a low concentration (1 ng/ml) intensified the migration and proliferation of gastric epithelial cells but not fibroblasts. On the other hand, both cell types were unable to migrate and proliferate after their exposure to a higher concentration of *H. pylori* LPS (25 ng/ml). Cell dysfunction in response to *H. pylori* LPS (25 ng/ml) has been associated with DNA damage, cell cycle arrest of epithelial cells (in S phase) and fibroblasts (in G₂ phase), as well as necrotic changes. Furthermore, the concentration of the epidermal growth factor (EGF) and phosphorylated STAT3 was reduced in response to a high dose of *H. pylori* LPS as compared to the control. This may explain the inability of the cells to repair wound.

The epithelial barrier disruption *in vivo* may result in the penetration of *H. pylori* antigens into the lamina propria and their interaction with immunocompetent cells.

Macrophages represent the first line of immune defense against infectious agents. Moreover, macrophages as antigen presenting cells (APC), which produce cytokines, contribute to the development of specific immune response. Lipid A of bacterial LPS can activate signaling pathways dependent on Toll-like receptors (TLR). However, due to the presence of sugar residues (Lewis determinants), *H. pylori* LPS may also be recognised by lectin receptors of host cells. This study has shown that *H. pylori* LPS binds to the soluble form of the C-type lectin receptor - DC-SIGN as well as its membrane-bound form on the surface of the THP- monocyte-macrophage leukemia cells. The binding of *H. pylori* LPS Lewis^{x/y} to the DC-SIGN receptor was found to be fucose specific, whereas the binding of *H. pylori* LPS without Lewis determinants was galactose specific.

The chronic nature of *H. pylori* infection can suggest that the activity of immune cells may be negatively modulated by *H. pylori* antigens. Due to the lack of information about the beginning of *H. pylori* infection in humans and its duration, studies on the pathogenesis and anti-*H. pylori* immune responses in humans are very difficult. Therefore we used an experimental model of *H. pylori* infection in guinea pigs. It was shown that the *H. pylori* infection lasting for 28 days resulted in the development of chronic local inflammatory response in the gastric mucosa. In *H. pylori*-infected guinea pigs antigen-specific lymphocytes, capable of proliferate in response to *in vitro* stimulation with *H. pylori* EG were detected in the local mesenteric lymph nodes, but not in peripheral blood. The lymphocytes, which expanded in response to EG, were T lymphocytes of CD4⁺ phenotype. T lymphocytes are the main producers of interferon (IFN)- γ , which drives the development of cellular immune response. In these studies, the elevated level of this cytokine was detected in the cell cultures containing lymphocytes proliferating in response to CagA. The activity of IFN- γ was not regulated negatively by the transforming growth factor (TGF- β) produced by immunocompetent cells present in the cell cultures. The expression of pro-inflammatory IL-1 β was detected only in monocyte-macrophage cells derived from animals non-infected with *H. pylori*. It cannot be excluded that the expression of this cytokine is negatively modulated *in vivo* during *H. pylori* infection.

In previous studies on human peripheral blood leukocytes isolated from both uninfected and *H. pylori*-infected individuals the soluble CagA and *H. pylori* LPS inhibited cell expansion, which was related to lymphocyte apoptosis and impairment of antigen presentation by macrophages. Using the guinea pig model of chronic *H. pylori* infection the inhibition of lymphocyte expansion by *H. pylori* LPS has been confirmed. It could be

due to the inability of macrophages to present antigens to lymphocytes in the cell cultures. Dysfunction of macrophages is associated with DNA damage, an elevated concentration of TGF- β and a reduced concentration of IFN- γ in the cell culture supernatants.

The results obtained in this study show that *H. pylori* antigens can disrupt homeostasis of the gastric mucosa, which *in vivo* may result in the infiltration of these antigens into the lamina propria and their interaction with immunocompetent cells. It has been shown that some *H. pylori* antigens, *i.e.* EG, CagA, UreA can increase the proliferative activity of gastric epithelial cells and fibroblasts, which could be important for the wound healing processes. However, the increased cell division rate can contribute to mutations that are potentially cancerous. *H. pylori* LPS (at a concentration of 25 ng/ml) has been found to inhibit the migration and proliferative active of gastric mucosal cells, which *in vivo* may result in reducing tissue repair and maintenance of inflammatory response. Inhibition of the cell function of macrophages as APC should be considered as a possible *H. pylori* mechanism downregulating the development of specific immune response of the host in order to establish persistent infection.

Michèle Eliza