

Streszczenie

Według raportu opublikowanego w 2017 r. przez Europejską sieć „*European Heart Network*” wykazano, iż choroba niedokrwienna serca (ChNS) jest jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Dane statystyczne stanowią istotny argument za podejmowaniem badań w kierunku wyjaśnienia przyczyn i mechanizmów patogenezy tej choroby celem zmniejszenia zachorowalności i śmiertelności. Podłożem tej choroby jest proces miażdżycowy w naczyniach wieńcowych powiązany z rozwojem patologicznej reakcji zapalnej. Do uznanych czynników ryzyka ChNS należą zaburzenia gospodarki lipidowej, współistniejące z otyłością i cukrzycą oraz nadciśnieniem tętniczym, a także czynniki środowiskowe: dieta, nikotynizm oraz stres. W patogenezie miażdżycy rozpatruje się również udział czynników zakaźnych wywołujących przewlekłą reakcję zapalną, w tym Gram-ujemnych pałeczek *Helicobacter pylori*, kolonizujących nabłonek żołądka i dwunastnicy. Skutkiem takich zakażeń może być powstawanie nadżerek i wrzodów tych narządów, a także raka żołądka. Uszkodzenie nabłonka żołądka może sprzyjać zaburzeniu jego funkcji barierowej, przenikaniu komponentów tych bakterii do błony podstawnej i oddziaływaniu na śródbłonek naczyniowy oraz infiltrujące komórki immunokompetentne. Oddziaływania komponentów *H. pylori* z komórkami gospodarza mogą skutkować rozwojem przewlekłej reakcji zapalnej oraz towarzyszących takiej reakcji procesów patologicznych w miejscu zakażenia lub ogólnoustrojowych.

Mając na uwadze wysoką częstość zakażeń *H. pylori* ogółem w populacji ludzkiej oraz u osób z ChNS, podwyższone stężenie u takich pacjentów cholesterolu i jego frakcji oksydowanej oraz stosowanie w celach leczniczych kwasu acetylosalicylowego (ASA, *acetylsalicylic acid*) założono, że zarówno komponenty *H. pylori*, oksydowane lipidy, a także ASA mogą współdziałać w rozwoju reakcji zapalnej, która potencjalnie może nasilać objawy ChNS. Aby ocenić współdziałanie zdefiniowanych komponentów *H. pylori*: kompleksu antygenowego w formie ekstraktu glicynowego (GE, *glycine extract*), podjednostki UreA ureazy, białka CagA związanego z cytotoksyną (*cytotoxin associated gene A protein*), lipopolisacharydu (LPS, *lipopolisacharide*) oraz ASA i 7-ketocholesterolu (7-kCh, *7-ketocholesterol*), w rozwoju oraz kontroli reakcji zapalnej na poziomie bariery nabłonkowej żołądka lub śródbłonka naczyń krwionośnych, wykonano badania *in vitro* na modelu ludzkich komórek nabłonka żołądka AGS

(ATCC®, CRL-1739™) oraz śródbłonna naczyniowego HUVEC (Lonza, C2517A), a także leukocytów krwi obwodowej zdrowych dawców i ludzkich monocytów THP-1 (ATCC®, TIB-202™), eksponowanych na działanie komponentów *H. pylori*, ASA lub 7-kCh, niezależnie lub łącznie.

Badania obejmowały: **1)** Ocenę stabilności obu barier komórkowych na podstawie aktywności metabolicznej komórek, wyznaczników stresu oksydacyjnego: aktywnej mieloperoksydazy (MPO, *myeloperoxidase*), reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*), peroksydacji lipidów oraz apoptozy i przepuszczalności; **2)** Ocenę aktywności prozapalnej komórek nabłonkowych żołądka, śródbłonna naczyń krwionośnych oraz leukocytów krwi obwodowej zdrowych dawców w zakresie: ekspozycji cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ICAM-1, *intracellular adhesion molecule 1*), aktywacji ścieżki sygnałowej STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), wydzielania mediatorów pro-zapalnych: interleukiny (IL)-8, IL-33, czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), IL-2, metaloproteinazy 9 (MMP-9, *matrix metalloproteinase 9*) oraz chemotaksji komórek immunokompetentnych; **3)** Ocenę właściwości proregeneracyjnych komórek nabłonkowych żołądka i śródbłonna naczyń krwionośnych oraz ekspansji komórek immunokompetentnych na podstawie migracji i proliferacji.

Wykazano, iż komponenty *H. pylori* zaburzają homeostazę bariery nabłonkowej żołądka, co wyraża się wzrostem odsetka komórek ulegających apoptozie, wskutek narastającego stresu oksydacyjnego, prawdopodobnie nasilanego w środowisku MMP-9, a także zaburzenia integralności. Wykazano, że reakcją na uszkodzenie tej bariery jest aktywacja komórek nabłonkowych w środowisku antygenów *H. pylori* wyrażająca się nasileniem ekspozycji ICAM-1, aktywacją STAT3, wydzielaniem cytokin prozapalnych: IL-8, IL-33, TNF- α , IL-2, a także MMP-9. Wykazane nasilenie chemotaksji leukocytów jednojądrzastych i ich aktywność sekrecyjna świadczy o mobilizacji komórek immunokompetentnych, których aktywność *in vivo* może być nakierowana na eliminację zakażenia i naprawę uszkodzenia. Wykazano jednak, że zdolność komórek nabłonkowych żołądka do regeneracji uszkodzeń w środowisku komponentów *H. pylori* była znacznie osłabiona, co znajdowało wyraz w zaburzeniu migracji komórek i ich aktywności proliferacyjnej, która nie ulegała nasileniu nawet w środowisku IL-33 i MMP-9, które same taką aktywność stymulowały. Wykazano

natomiast znaczenie tych mediatorów w nasilaniu aktywności proliferacyjnej monocytów THP-1, co może mieć znaczenie w eliminacji zakażenia *H. pylori*, ale przy nadmiernej ich aktywacji może sprzyjać narastaniu reakcji zapalnej. Efekty oddziaływania komponentów *H. pylori* na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych były porównywalne, a niekiedy silniej wyrażone niż w hodowlach komórek nabłonka żołądka, co wskazuje na możliwość indukowania i modulowania reakcji zapalnej na poziomie bariery śródbłonka naczyniowego podczas zakażenia *H. pylori*.

Wykazano znaczenie ASA i 7-kCh, jako egzogennych czynników sprzyjających zaburzeniu integralności zarówno bariery nabłonkowej żołądka, jak i śródbłonka naczyń krwionośnych, niezależnie lub łącznie z komponentami *H. pylori* oraz w promowaniu reakcji zapalnej.

Uzyskane wyniki wskazują na znaczenie rozpuszczalnych komponentów *H. pylori* w uszkodzeniu bariery komórek nabłonkowych żołądka i śródbłonka naczyń krwionośnych oraz inicjowaniu reakcji zapalnej. Środowisko ASA i 7-kCh nasila działanie komponentów *H. pylori*, co pozwala sugerować, iż podczas zakażenia *H. pylori* u osób z chorobą niedokrwienną serca, czynniki te mogą modulować reakcję zapalną w przebiegu tej choroby.

Gajdoska Aohron

Summary

According to the report published in 2017 by the European network "European Heart Network", coronary heart disease (CHD) has been shown to be one of the leading causes of death in the world. Statistical data is an important argument for developing research to explain the risks and mechanisms of pathogenesis of this disease in order to reduce morbidity and mortality. The reason of this disease is the atherosclerosis process in the coronary vessels associated with the development of a pathological inflammatory reaction. The recognized risk factors for CHD include lipid disorders as well as obesity, diabetes, hypertension and environmental factors such diet, nicotinism and stress. In the pathogenesis of atherosclerosis, the role of infectious agents that cause a chronic inflammatory response is also considered, including Gram-negative bacteria *Helicobacter pylori*, colonizing the epithelium of the stomach and duodenum. The result of such infections may be the development of local inflammatory response in the gastric mucosa, erosions and ulcers of these organs, as well as gastric cancer. Damage to the gastric epithelium may contribute to the disruption of its barrier function, penetration of the components of these bacteria into the basement membrane and their interactions with the vascular endothelium as well as infiltrating immunocompetent cells. These interactions may result in the development of a chronic inflammation and the pathological processes accompanying such a reaction at the site of infection or on the systemic level.

Considering the high incidence of *H. pylori* infections in the human population and in patients with CHD, the elevated concentration of cholesterol and its oxidized fraction in such patients and the therapeutic use of acetylsalicylic acid (ASA) it was assumed that both *H. pylori* components, oxidized lipids as well as ASA can interplay in the development of an inflammation that can potentially increase the symptoms of CHD. To assess the interactions of defined *H. pylori* components: antigenic complex in the form of glycine extract (GE), UreA urease subunit, CagA cytotoxin-associated protein, lipopolysaccharide (LPS) and ASA and 7-ketocholesterol (7-kCh) in the development and control of inflammatory response at the level of the epithelial barrier of the stomach or endothelium of blood vessels, *in vitro* tests were carried out on human gastric epithelial cells AGS (ATCC®, CRL-1739™), HUVEC vascular endothelial cells (Lonza, C2517A), peripheral blood leukocytes of healthy donors and human THP-1 monocytes (ATCC®, TIB-202™), exposed to *H. pylori* components, ASA or 7-kCh, independently or in combination.

The study included: **1)** Evaluation of the stability of both cellular barriers based on the cell metabolic activity, oxidative stress determinants: active myeloperoxidase (MPO), reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, apoptosis and permeability of cell monolayers; **2)** Evaluation of proinflammatory activity of gastric epithelial cells, endothelial cells and peripheral blood leukocytes of healthy donors in the range of: intercellular adhesion molecule deposition (ICAM-1), activation of signal pathway STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), secretion of pro-inflammatory mediators: interleukin(IL)-8, IL-33, tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-2, metalloproteinase 9 (MMP-9) and chemotaction of immunocompetent cells; **3)** Evaluation of the pro-regenerative properties of gastric epithelial cells and endothelial cells as well as expansion of immunocompetent cells based on migration and proliferation.

It was shown that *H. pylori* components affect the homeostasis of gastric epithelial barrier, which is expressed by the increase in the percentage of cells undergoing apoptosis, due to the increasing oxidative stress, probably elevated in the milieu of MMP-9, as well as diminished cell integrity. The reaction to damage of this barrier was the activation of epithelial cells in response to *H. pylori* antigens expressed by the elevated cell exposure of ICAM-1, STAT3 activation, secretion of pro-inflammatory cytokines: IL-8, IL-33, TNF- α , IL-2 as well as MMP-9. The increased chemotaxis of mononuclear leukocytes and their secretory activity indicates the mobilization of immunocompetent cells. Activated leukocytes *in vivo* may be involved in the elimination of infection and repair of damage. However, in this study it was shown that the ability of gastric epithelial cells to regenerate lesions, in the environment of *H. pylori* components, was significantly impaired, which was reflected in the inhibition of cell migration and their proliferative activity. This activity was not increased even in the milieu of IL-33 and MMP-9, which themselves stimulated cell proliferation. However, the importance of both IL-33 and MMP-9 in increasing the proliferative activity of THP-1 monocytes has been demonstrated, which may be important in the elimination of *H. pylori* bacteria during infection. On the other hand their excessive activation may promote the development of chronic inflammatory response. The effects of *H. pylori* components on vascular endothelial cells were comparable and sometimes even more strongly expressed than in cultures of gastric epithelial cells, which indicated the possibility of inducing and

modulating an inflammatory processes at the level of the vascular barrier during *H. pylori* infection.

The importance of ASA and 7-kCh as exogenous factors that reduce the integrity of both gastric epithelial cell barrier and the barrier of vascular endothelium, independently or in combination with *H. pylori* components, and in promotes inflammatory response has been demonstrated.

In summary, the results obtained in this study indicate that soluble *H. pylori* components are able to damage the barrier of both gastric mucosa and vascular endothelial cells, which leads to the initiation of an inflammatory response involving both gastric epithelial and vascular endothelial cells as well as immunocompetent cells. Moreover ASA and 7-kCh can increase the potency of *H. pylori* components, suggesting that in patients with CHD infected with *H. pylori*, these factors may interact in modulating the inflammatory response and the maintaining or the progression of this disease.

Gojowski Adam