WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

Weronika Gonciarz

Patogeneza zakażeń *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowych oraz modelach komórkowych *in vitro*

Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infections on the guinea pigs model and cell models *in vitro*

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Immunologii
i Biologii Infekcyjnej
Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii
i Immunologii

Promotor:

- Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Promotor pomocniczy:

- Dr Karolina Rudnicka

Łódź, 2020

„Nigdy nie rezygnuj z celu tylko dlatego,

że osiągnięcie go wymaga więcej czasu.

Czas i tak upłynie”.

- H. Jackson Brown

Prawa autorskie i warunki dystrybucji

Niniejsza rozprawa doktorska zawiera artykuły oryginalne, publikowane za zgodą wydawnictw: Biomedcentral (BMC), Public Library of Science, MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute), Baishideng Publishing Group Inc, Hindawi Publishing Corporation, Wiley Sons z zastrzeżeniem, że opracowanie ma charakter niekomercyjny, a jego dystrybucja ma zasięg lokalny, akademicki, ograniczający się do celów przygotowania pracy doktorskiej i nie będzie publikowane w wersji *on-line*. Jakakolwiek forma powielania pracy przez osoby trzecie wymaga uprzedniej zgody autorki oraz wyżej wymienionych Wydawnictw.

Copyright and distribution policy

The doctoral thesis includes original articles published under a permission of the copyright holders and the following publishing corporations Biomedcentral (BMC), Public Library of Science, MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute), Baishideng Publishing Group Inc, Hindawi Publishing Corporation, Wiley Sons on the condition that the permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted *on-line* separately or distributed commercially. The circulation is limited to non-commercial, local, academic distribution. This thesis may not be reproduced or transmitted in any form or by any means by the third party, without prior permission of the author and copyright holders.

Wskazówki do cytowania niniejszej pracy

Weronika Gonciarz (2020) Patogeneza zakażeń *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowych oraz modelach komórkowych *in vitro.* Rozprawa doktorska. Uniwersytet Łódzki

SPIS TREŚCI

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej **5**
Pozostałe publikacje **7**
Udział w konferencjach naukowych **10**
Źródła finansowania **21**
Streszczenie w języku polskim **23**
Streszczenie w języku angielskim **26**
Wykaz stosowanych skrótów **29**
Wprowadzenie **38**
Rys historyczny **39**
Epidemiologia zakażeń *Helicobacter pylori* **41**
Diagnostyka zakażeń *H. pylori* **44**
Leczenie zakażeń *H. pylori* **48**
Profilaktyka **49**
Charakterystyka najważniejszych czynników wirulencji *H. pylori* **50**
Cytokiny i cząsteczki sygnałowe w zakażeniu *H. pylori* **65**
Rozwój procesów odpornościowych podczas zakażenia *H. pylori* **73**
Kawia domowa jako model doświadczalny w zakażeniu *H. pylori* **76**
Cele pracy **78**
Materiały i metody **81**
Materiały **81**
Metody **88**
Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej **108**
Dyskusja **192**
Podsumowanie wyników **222**
Wniosek końcowy **227**
Literatura **229**
Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach **278**

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

I. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection.

Gonciarz W, Walencka M, Moran AP, Obuchowski M, Hinc K, Chmiela M.

Journal of Biomedical Science. **2019**; 26:23: DOI:.10.1186/s12929-019-0515-z
[$IF_{5\ letni}$ =5,203; MNiSW=**100**].

II. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts.

Gonciarz W, Krupa A, Hinc K, Obuchowsk M, Moran AP, Gajewski A, Chmiela M.

PLoSOne, **2019**; 7:1, e0220636; DOI: 10.1371/journal.pone.0220636.
[$IF_{5\ letni}$ =2,776; MNiSW=**100**].

III. Proregenerative activity of IL-33 in gastric tissue cells undergoing *Helicobacter pylori*-induced apoptosis

Gonciarz W, Krupa A, Chmiela M.

International Journal of Molecular Science, 2020; 5;21, ; do:10.3390/ijms21051801
[$IF_{5\ letni}$ =4,183; MNiSW=**140**].

IV. Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infection.

Chmiela M, **Gonciarz W.**

World Journal of Gastroenterology, ***2*017**; 23:3964–3977; DOI:10.3748/wjg.v23.i22.3964.
[$IF_{5\ letni}$= 3,411; MNiSW=**100**]

V. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients.

Gonciarz W, Matusiak A, Rudnicka K, Rechciński T, Chałubiński M, Czkwianianc E, Broncel M, Gajewski A, Chmiela M.

APMIS, **2019;** 127: 139–149; DOI: 10.1111/amp.12925.
[$IF_{5\ letni}$ =2,225; MNiSW=**70**].

Pozostałe publikacje

1. **New γ-halo-δ-lactones and δ-hydroxy-γ-lactones with strong cytotoxic activity.**

   Kamizela A, Gawdzik B, Urbaniak M, Lechowicz Ł, Białońska A, Kutniewska S, Gonciarz W, Chmiela M.
   Molecules, **2019,** 24, 1875.; DOI:10.3390/molecules24101875].
   [$IF_{5\ letni}$ =3,089; MNiSW=**100**].

2. **Complexes in aqueous cobalt(II)-2-picolinehydroxamic acid system: Formation equilibria, DNA-binding ability, antimicrobial and cytotoxic properties.**

   Woźniczka M, Świątek M, Pająk M, Gądek-Sobczyńska J, Chmiela M, **Gonciarz W,** Lisiecki P, Pasternak B, Kufelnicki A.
   Journal of Inorganic Biochemistry, **2018;** 187:62-72; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.07.010.
   [$IF_{5\ letni}$: 3,263; MNiSW= **70**]

3. **Synthesis, characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties of trans γ-halo-δ-lactone.**

   Kamizela A, Gawdzik B, Wzorek A, Urbaniak M, Lechowicz Ł, Biołońska A, **Gonciarz W,** Chmiela M.
   Chemistry Open, **2018**; 7:543 – 55; DOI: 10.1002/open.201800110.
   [$IF_{5\ letni}$: 2,801; MNiSW= **70**]

4. **Host pathogen interactions *in Helicobacter pylori* related gastric cancer.**

   Chmiela M, Karwowska Z, **Gonciarz W,** Allushi B, Stączek P.
   World Journal of Gastroenterology, **2017;** 23:1521-1540; DOI: 10.3748/wjg.v23.i9.1521.
   [IF_{5letni}:2,848; MNiSW= **100**]

5. **Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *Helicobacter pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion.**

   Mnich E, Gajewski A, Rudnicka K, **Gonciarz W**, Stawerski P, Hinc K, Obuchowski M, Chmiela M.
   Acta Biochimica Polonica, **2015**; 62: 641-650; DOI: 10.18388/abp.2015_1045 .
   [$IF_{5\ letni}$=1,534; MNiSW=**40**]

6. **The microbiological, histological, immunological, and molecular determinants of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs as a convenient animal model to study pathogenicity of these bacteria and the infection dependent immune response of the host.**

Walencka M, **Gonciarz W**, Mnich E, Gajewski A, Stawerski P, Knapik-Dabrowicz A, Chmiela M. *Acta Biochimica Polonica*, **2015**; 62: 697-706; DOI: 10.18388/abp.2015_1110.
[$IF_{5\ letni}$=1,534; MNiSW= **40**]

Łączny $IF_{5\ letni}$ wszystkich publikacji =**32,866; MNiSW = 930**

Pozostały dorobek naukowy

Publicjkacje popularno-naukowe i monografie naukowe

1. Ograczyk E, Wawrocki S, Gajewski A, Kawka M, **Gonciarz W,** Rudnicka K, Sadowska B, Chmiela M. (2017). Antybiotykooporność drobnoustrojów w kontekście aktualnego raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Labolatorium. Przegląd Ogólpopolski, (7/17).
2. **Gonciarz W**, Konieczna I, Relich I, Kolesińska B, Frączyk J, Kwinkowski M, Kamiński Z, Kaca W. Analysis of anti-CCRL1 antibodies in human sera using quantitative dot blot method. *Biotechnology progress – polish students interests,* 2014; 8-17 [ISBN 978-83-936882-2-7].
3. **Gonciarz W.** „Oszukanie" układu odpornościowego – rozważania nad rolą mimikry molekularnej w reaktywnym zapaleniu stawów na podstawie analizy bioinformatycznej. *Interdyscyplinarność przyszłością nauki,* 2014; 47-53 [ISBN: 978-83-935220-2-6, Nr wydawcy: 935220].
4. **Gonciarz W**, Żmijewska K. Mikrobiologiczne biosensory. *Zeszyt Studenckiego Ruchu Naukowego. Wydawnictwo UJK,* 2013; 103-110 [ISSN 1231-1006].
5. **Gonciarz W.** Bakterie w bioremediacji gleby. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa. Instytut Badań Edukacyjnych*, 2013; 3(4) 17-22 [ISSN 1643-8779]; [IF=0, MNiSW=8]
6. **Gonciarz W**, Macander B, Nowakowska M. Quantitate analysis of cultivable soil bacteria and determination of aromatic hydrocarbons degrading bacteria. *Cracow/Science by students - review of biotechnology students research interests*. Chapter in monograph, 2013; 54-60 [ISBN 978-83-936882-0-3].

Uczestnictwo w konferencjach naukwych

Wyniki pracy doktorskiej prezentowano łącznie w formie **19** ustnych i **16** plakatowych doniesień zjazdowych na konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Pozostałe wyniki prezentowano w formie **90** doniesień konferencyjnych.

Konferencje międzynarodowe

Doniesienia ustne

- 18th International Congress of Young Medical Scientists. Poznań, 15-17.06.2018 r.
  (1) **Induction of apoptosis in gastric epithelial cells barrier by *H. pylori* components.**
  Gonciarz W., Gajewski A., Hinc K., Obuchowski M., Chmiela M.
- 14th Warsaw International Medical Congress. Warszawa, 10-13.05.2018 r.
  (2) **Antibody production to ATVLA sequence present in *H. pylori* CagA/HspB proteins and human Hsp60 protein during experimental *H. pylori* infection in *Cavia porcellus.***
  Gonciarz W., Gajewski A., Matusiak A., Chmiela M.

- XVI Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology. Warszawa, 8-10 .06. 2017 r.

  (3) ***In vivo* model of *H. pylori* infection in *Cavia porcellus* – role of IL- 33 and MMP-9 in gastric epithelial cell barrier damage and inflammatory response.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Mnich E., Walencka M., Chmiela M.

- III International Conference of Cell Biology. Kraków, 26-28.05. 2017 r.

  (4) **Estimate the prevalence of IL- 33 in gastric tissue sections in *H. pylori* infection in the guinea pig model.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Mnich E., Chmiela M.

- Internationational Medical Congress. Lublin, 31.03- 01. 04 2017 r.

  (5) **The serological markers of *Helicobacter pylori* infection on guinea pig model.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Głaczyńska M., Walencka M., Chmiela M.

- BioChemMed Sessions. Gdańsk, 25-27.11.2016 r.

  (6) **The *cagA* and *ureC* gene sequences as markers of *Helicobacter pylori* infection in *Caviae porcellus* model.**

  Gonciarz W., Walencka M., Chmiela M.

- 12th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections. Konventum, Helsingør, Dania, 29.06-02.07.2016 r.

  (7) **IL-33 and MMP-9 as markers of gastric epithelial cell barrier damage and inflammatory response. *In vivo* model of *H. pylori* infection in *Cavia porcellus*.**

  Gonciarz W., Walencka M., Mnich E., Gajewski A., Chmiela M.

- Internationational Medical Congress. Lublin, 11-13.03.2016 r.

  (8) **Determinants of *Helicobacter pylori* inflammatory response in guinea pig model.**

  Gonciarz W., Walencka M., Chmiela M.

- XVII National Academic Seminar of Biotechnology Students & VII International Conference of Biotechnology Students. Poznań, 20-22.11.2015 r.

  (9) **Humoral and cellular determinants of *H. pylori* inflammatory response in guinea pig model.**

  Gonciarz W., Mnich E., Walencka M., Chmiela M.

Doniesienia plakatowe

- XXXIII International Workshop on *Helicobacter* & Microbiota in Inflammation & Cancer. Insbruck, Austria. 5-9.09. 2019 r.

  (10) **Leukocytes as a marker of immune response in experimental *in vivo* model in *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs model**

  Gonciarz W., Krupa A., Chmiela M.

- 8th International Weigl Conference: Human Welfare And Infectious Diseases In A New Microbiome Research Ara Microorganisms In Industrial And Medical Biotechnology. Łódz, 26-28.06.2019r.

  (11) **Upregulation of pro-apoptotic proteins in response to *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs and cellular model**.

  Gonciarz W., Krupa A., Obuchowski M., Hinc K., Chmiela M.

- 13th International Seminar: "Biomolecules – Identification and Functions". Kraków 21-22.09.2018r.

  (12) **Upregulation of MUC5AC mucin versus colonization of gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori.***

  Gonciarz W., Walencka M., Obuchowski M., Hinc K., Chmiela M.

- XXXIInd International Workshop on *Helicobacter* & Microbiota in Inflammation & Cancer. Kowno, Litwa.14-15.09.2018r.

  (13) **Modulation of gastric barrier in the milieu of *Helicobacter pylori* compounds. Possible role of IL-33.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Krupa A., Chmiela M.

- 13th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections. Konventum, Helsingør, Dania, 04-07.07.2018 r.

  (14) **Possible role of IL-33 in the gatric barrier homeostasis during *Helicobacter pylori* infection.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Krupa A., Chmiela M.

- Young Researchers in Live Science. Paryż, Francja 2-4.05.2018 r.

  (15) **Ki67 as a marker of gastric epithelial cell proliferation in *Cavia porcellus* infected with *Helicobacter pylori*.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Walencka M., Karwowska Z., Chmiela M.

- 7th International Weigl Conference. Lwów, 26-29.09.2017 r.

  (16) **Production of IL-33 and MMP-9 in response to *H. pylori* infection on the primary guinea pig gastric cells.**

  Gonciarz W., Gajewski A., Walencka M., Hinc K., Obuchowski M., Chmiela M.

- MIKROBIOT 2017 Microbiology in Health Care and Environmental Protection. Łódź, 19-20.09.2017 r.

  (17) **MPO, IL- 33 and MMP-9 as markers of gastric epithelial cell barrier damage and inflammatory response. *In vivo* model of *H. pylori* infection in C*avia porcellus.***

  Gonciarz W., Gajewski A., Hinc K.., Obuchowski M., Chmiela M.

  (18) **Production of IL-33 and MMP-9 by guinea pig primary gastric cells in response to *H. pylori* challenge.**

  Gonciarz W., Walencka M**.,** Gajewski A., Hinc K., Obuchowski M., Chmiela M.

- XXXth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer. Bordeaux, France 7-9.09.2017 r.

(19) **Possible link between *Helicobacter pylori* CagA /HspB proteins and inflammatory response due to molecular mimicry.**

Gonciarz W., Gajewski A., Matusiak A., Chmiela M.

- BioChemMed Sessions. Gdańsk, 25-27.11.2016 r.

(20) **Experimental model of *Helicobacter pylori* infection in *Caviae porcellus.* Standardization of culture methods.**

Gonciarz W., Gajewki A., Walencka M., Chmiela M.

- XXIXth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer. Magdeburg, Niemcy, 15-17.09.2016 r.

(21) **Biomarkers of experimental *Helicobacter pylori* infection in *Cavia porcellus*.**

Gonciarz W., Walencka M., Mnich E., Chmiela M.

(22) **Production of MMP-9 in response to *Helicobacter pylori* infection. Cellular model *in vitro*.**

Gonciarz W., Mnich E., Walencka M., Hinc K., Obuchowski M., Moran A.P., Chmiela M.

- 6th International Weigl Conference on Microbiology. Gdansk, 8-10.07.2015 r.

(23) **Monitoring of *H. pylori* infection in guinea pig model by culture and molecular *ureC/cagA* determinants.**

Walencka M., Gonciarz W., Miszczyk E., Chmiela M.

Konferencje krajowe

Doniesienia ustne

- Postępy w badaniach biomedycznych. Warszawa, 1-2.12.2018 r.

(24) **Wyznaczniki stresu oksydacyjnego w komórkach pierwotnych nabłonka żołądka kawii domowej traktowanych antygenami *Helicobacter pylori.***

Gonciarz W., Hinc K., Obuchowski M., Chmiela M.

- II Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego. Łódź, 08.06.2018 r.

(25) **Znaczenie mucyny 5 w kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka przez pałeczki *Helicobacter pylori.***

Gonciarz W., Gajewski A., Hinc K., Obuchowski M., Chmiela M.

- VII Konferencja Biologii Molekularnej. Łódź, 12-14.04. 2018 r.

(26) **Zależność pomiędzy zakażeniem *Helicobacter pylori* a wytwarzaniem przeciwciał krzyżowo reagujących z białkami ludzkimi.**

Gonciarz W., Gajewski A., Matusiak A., Chmiela M.

- Postępy w badaniach biomedycznych. Warszawa, 16-17.12.2017 r.

(27) **IL-33 i MMP-9 jako markery uszkodzenia błony śluzowej żołądka w zakażeniu *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowej.**

Gonciarz W., Gajewski A., Hinc K., Obuchowski M., Chmiela M.

- VI Konferencja Biologii Molekularnej. Łódź, 06-08.04.2016 r.

(28) **IL-33 jako marker uszkodzenia bariery komórkowej w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori.* Badania na modelu *in vitro* fibroblastów kawii domowej.**
Gonciarz W., Gajewski A., Mnich E., Chmiela M.

- Postępy w naukach biomedycznych. Warszawa, 10-11.12.2016 r.

(29) **Nieinwazyjne testy w diagnostyce zakażeń *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowej.**
Gonciarz W., Gajewski A., Walencka M., Mnich E., Chmiela M.

- XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Bydgoszcz, 25-27.09.2016 r.

(30) **IL-33 i MMP-9 jako markery uszkodzenia nabłonka żołądka i odpowiedzi zapalnej w modelowym zakażeniu *H. pylori* u kawii domowej.**
Gonciarz W., Mnich E., Gajewski A., Walencka M., Matusiak A., Chmiela M.

- V Konferencja Biologii Molekularnej. Łódź, 07-09.04.2016 r.

(31) **Opracowanie metody PCR do identyfikacji pałeczek *Helicobacter pylori* w tkance żołądka świnki morskiej.**
Gonciarz W., Walencka M., Chmiela M.

- Mikrobiologia w Medycynie, Przemyśle i Ochronie Środowiska. Łódź, 24-25.10.2015 r.

(32) **Ocena zakażenia *H. pylori* metodami mikrobiologicznymi, histologicznymi, molekularnymi i serologicznymi na modelu świnki morskiej.**
Gonciarz W., Walencka M., Chmiela M.

- III Studencka Konferencja Biologii Medycznej "Biofuzje". Warszawa, 22-24.05.2014 r.

(33) **Serologiczne wyznaczniki zakażenia *H. pylori* na modelu świnki morskiej.**
Gonciarz W., Walencka M., Chmiela M.

Doniesienia plakatowe

- IV ogólnopolska konferencja doktorantów nauk o życiu BIOPEN. Łódź, 24-25.05.2018 r.

(34) **Mechanizm kompensacji uszkodzenia nabłonka żołądka w modelowym zakażeniu *H. pylori* u kawii domowych.**
Gonciarz W., Gajewski A., Walencka M., Chmiela M.

- XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Bydgoszcz, 25-27.09.2016 r.

(35) **Histologiczne wyznaczniki miejscowej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka u kawii domowych zakażonych eksperymentalnie *Helicobacter pylori.***
Gonciarz W., Walencka M., Mnich E., Chmiela M.

Uczestnicwo w projektach naukowych

Kierownik

1. „Rola IL-33 w monitorowaniu uszkodzenia komórek nabłonkowych żołądka w zakażeniu *Helicobacter pylori".* (Dofinansowanie zadania badawczego dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich 2019, B1911000002123.02) 09-12.2019, Uniwersytet Łódzki.

2. „Znaczenie mucyny 5 w kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka przez pałeczki *Helicobacter pylori*" (Dofinansowanie zadania badawczego dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich 2018, B1811000001830.02), 09.04.2019-31.12.2019, Uniwersytet Łódzki.
3. „IL-33 i MMP-9 jako markery uszkodzenia komórek nabłonkowych żołądka w zakażeniu *Helicobacter pylori.* Badania *in vitro* na linii pierwotnej komórek nabłonkowych żołądka kawii domowej". (Dofinansowanie zadania badawczego dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich 2017, B1711000001545.02), 18.04.2017-31.12.2017, Uniwersytet Łódzki.

Wykonawca

1. **„**Opracowanie i przygotowanie do wdrożenia innowacyjnego systemu niezacieranych antybakteryjnych posadzek cienkowarstwowych". We współpracy z Oddziałem Ceramiki i Betonów Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych Sieci Badawczej ŁUKASIEWICZ. B1911000000240.03.(20.11-20.12.19r.).
2. "Zastosowanie suplementu diety i żywności specjalnego przeznaczenia medycznego w łagodzeniu dolegliwości towarzyszących skąpoobjawowym zakażeniom *Helicobacter pylori*"" We współpracy z ICHEM sp.zo.o. B1911000000219.03. (01.06-31.08.19r.)
3. "Immunomodulatory activity of selected plant extracts". We współpracy z The Fruit Company IPRONA. B1821000000187.03. (01.05-30.05.19r)
4. „The *in vitro* evaluation of stimulatory potential of 11 elderberry extracts obtained by different extraction techniques". We współpracy z The Fruit Company IPRONA. B1811000000212.03. (02.11-18r. 31.03.19r.)
5. "Development of dietary suplemet to treat symptomatic *Helicobacter pylor*i infections" (Finacial suport withim UE projects),(Poddziałnie 2.3.2 Bony na innowacje dla MŚP", Działanie 2.3 "Promowanie usług dla przedsiębiorstw" Oś priorytetowa II, "Wsparcie otoczenia i potencjału przedsiębiorstw dla prowadzenia działalności B+R+. Program Operacyjny Inteligentny, Rozwój 2014-2020). We współpracy z ICHEM sp.zo.o . B1611000000108.03.
6. „Ocena właściwości immunostymulujacych i przeciwdrobnoustrojowych mieszanki ekstraktów roślinnych wobec *H. pylori".* We współpracy z ICHEM sp.zo.o. We współpracy z ICHEM sp.zo.o. B1711000000142.03. (01.08.2017r.-30.09.2017r.)
7. „Odpowiedź limfocytów NKT na glikolipidowe ligandy *Helicobacter pylori* w kontekście cząsteczki CD1d - znaczenie w rozwoju odporności" (SONATA12, UMO-2016/23/D/NZ6/02553), (2017-2020), Uniwersytet Łódzki.
8. "Determinants of inflammatory and immune response in guinea pigs infected with *H. pylori* (PRELUDIUM 5, UMO-2013/09/N/NZ6/00805), (2014-2016), Uniwersytet Łódzki.
9. „Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchni soczewek kontaktowych i ich wpływ na zdrowie człowieka"(2015r.), Sekcja Mikrobiologiczna Studenckiego Koła Naukowego Biologów, Uniwersytet Łódzki.

10. "The usage of synthetic peptides mimicking flap region of bacterial ureases for estimation of anti-urease diversity in rheumatoid arthritis patients." (2011/03/D/NZ6/03316) (2012/2016), Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach.

11. „Występowanie szczepów lekoopornych bakterii mikroflory różnych rodzajów gleby"(projekt związany z badaniami w ramach dotacji statutowej dla młodej kadry), Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach .

Bezpośredni opiekun Studeckich Grantów Badawczch

1. „Ocena immunomodulacyjnych właściwości prątków BCG-onko wobec komórek nabłonka żołądka i makrofagów, eksponowanych na pałeczki *H. pylori"* (03.2020-06.2020), Uniwersytet Łódzki.
2. „Rola zakażenia *H.pylori* w destabilizacji białek ścisłych połączeń bariery nabłonkowej żołądka" (03.2020-06.2020), Uniwersytet Łódzki.
3. „Ocena roli prątków szczepionkowych BCG-onko w osłabieniu kolonizacji nabłonka żołądka przez pałeczki *Helicobacter pylori*" (02.2019-06.2019), Uniwersytet Łódzki.
4. „Zależność pomiędzy zakażeniem *Helicobacter pylori* a wytwarzaniem przeciwciał krzyżowo reagujących z receptorem TNF-α" (02.2019-06.2019), Uniwersytet Łódzki.
5. „Kompleks M3C – nowy preparat biologiczny o potencjalnym działaniu terapeutycznym" (06. 2018 - 09. 2018), Uniwersytet Łódzki.
6. „Wpływ melaniny wytwarzanej przez *Pseudomonas aeruginosa* oraz kompleksu melanina-Cu^{2+}-ceftazydym na linie komórkowe: ludzką linię monocytarną THP1-XBlue™ oraz fibroblasty mysie L929". (06.2017-12.2017), Uniwersytet Łódzki.

Staże

1. 06-31.08.2018r. Staż w Zakładzie Chemii Organicznej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach. Analiza próbek biologicznych przy wykorzystaniu metody spektroskopii w podczerwieni, w transformacji Fouriera (FT-IR).

2. 07. 2013- 09. 2013, Staż naukowy w Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Division of Clinical Microbiology, Karolinska Institute and Karolinska University Hospital, 17 176 Stockholm, Sweden, Realizacja projektu naukowgo pt.: Influence of vitamin D on the growth, biofilm formation and mRNA expression by uropathogenic *Escherichia coli*.

Kursy i szkolenia

1. E-learning - nauczanie zdalne w praktyce. Niepubliczna Placówka Szkolna24.pl. Szkolenie *on line*. 24.05. 2020 r.
2. Efektywna nauka zdalna - Metodyka nauczania i przepisy prawa. Niepubliczna Placówka Szkolna24.pl. Szkolenie *on line*. 23.05. 2020 r.
3. Weryfikacja i walidacja metod badawczych. BTL Sigma. Szkolenie *on line*. 07.04. 2020 r.
4. Learn fundamentals of Endnote. Platforma Udemy. Szkolenie *on line.* 20.03.2020 r.

5. Metody laboratoryjne stosowane w diagnostyce serologicznej na przykładzie testów. EUROIMMUN. Akademia Euroimmuni. Szkolenie *on line.* 22.02.2020 r.
6. Innowacyjne metody dydaktyczne. Instytut PWN. Warszawa, 11.02.2020 r.
7. Monitoring genetyczny myszy laboratoryjnych. AnimaLab. Łódź, 05.02.2020 r.
8. Badania komórkowe i mikroskopia. AnimaLab. Łódź, 14.03.2019 r.
9. Innowacyjne zastosowanie przełomowej technologii Biolog do identyfikacji oraz metabolicznego fenotypowania mikroorganizmów i komórek ssaczych. BioMaxima S.A. Łódź, 30.05.2018 r.
10. Rozwój kariery naukowej doktorantów poprzez granty Narodowego Centrum Nauki. Uniwersytet Łódzki. Łódź, 21.05.2018 r.
11. Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka chorób przenoszonych drogą płciową. Gdański Uniwersytet Medyczny. Gdańsk, 18-29.04.2018 r.
12. Mobilność naukowa i możliwości rozwoju kariery w ramach wybranych inicjatyw Unii Europejskiej. Uniwersytet Łódzki. Łódź, 22.05.2017 r.
13. Rynek pracy doktoranta/doktora. Wymagania i oczekiwania. Uniwersytet Łódzki, Łódź, 22.05.2017 r.
14. START-Stypendia dla wybitnych młodych uczonych, przyznawane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej. Uniwersytet Łódzki, Łódź, 22.05.2017 r.
15. Nowe testy komórkowe w czasie rzeczywistym oraz analiza metabolizmu energetycznego komórek. Promega. Łódź, 27.04.2017 r.
16. Możliwości współpracy nauki z przemysłem. Warsztaty interdyscyplinarne. Stowarzyszenie Rozwoju Karier Doktorantów i Doktorów PolDoc, Łódź, 21.01.2017 r
17. "Data mining w programie Statistica". Łódź, 07.11.2016 r.
18. Charakterystyka komórek macierzystych poprzez analizę potencjałów. Zaawansowana analiza komórek z wykorzystaniem precyzyjnych i całkowicie zautomatyzowanych systemów NucleoCounter. Idealna stymulacja różnorodnych warunków środowiskowych IBIDI. AnimaLab, Warszawa, 27.10.2016 r.
19. Rozwiązywanie konfliktów w zespole. Stowarzyszenie Rozwoju Karier Doktorantów i Doktorów PolDoc, Łódź, 9.04.2016 r.
20. Szkolenie w zakresie wykonywania procedur prowadzonych na następujących gatunkach zwierząt: mysz domowa, szczur wędrowny, świnka morska, królik europejski, żaba wodna, zwierzęta dziko żyjące. Uniwersytet Łódzki, Lódź,11-18.12.2015 r.
21. Zastosowanie techniki Real Time PCR do detekcji mikroorganizmów. Amplicon, Wrocław, 16-17.11.2015r.
22. Aplication of nanomatereials in nanomedicine and biotechnology. Uniwersytet Łódzki, Lódz, 12-14.10.2015r.
23. Application of flow cytometry in molecular oncology. BASTION From Basic To Translational Research In Oncology, Warszawski Uniwersyet Medyczny, Warszawa, 05.10. 2014 r.

Nagrody i wyróżnienia

1. Druga nagroda za najlepsze doniesienie plakatowe podczas XXIII Sympozjum Postępy w Medycynie Zakażeń, Warszawa 6-7.12.2019r. Zaburzenia czynności śródbłonka naczyniowego w obliczu zakażeń wywołanych przez *Helicobacter pylori.*
2. Pierwsze miejsce za najlepsze doniesie ustne podczas konferencji Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa 30.11.2019r. Wytwarzanie przeciwciała krzyżowo reagujących z receptorem TNF-alfa podczas zakażenia *Helicobacter pylori.*
3. Nagroda za najlepszy plakat podczas III Sesji Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź 07.06.2017r. Zastosowanie sztucznych sieci neuronowych (SSN) i spektroskopii w podczerwieni (IR) do identyfikacji zakażenia *Helicobacter pylori* u dzieci.
4. Nagroda za najlepsze wystąpienie ustne podczas III Sesji Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź 07.06.2017r. Charakterystyka fizykochemiczna i interakcje z komórkami eukariotycznymi piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa.*
5. Nagroda za najlepsze wystąpienie ustne doktorantów podczas X Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików. Łódź, 04.06.2019r. Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni (IR) do identyfikacji unikatowych fragmentów widm w zakażeniu *H. pylori.*
6. Nagroda Instytutu Biologii Medycznej PAN za najlepszą prezentację plakatu na pograniczu chemii i biologii podczas X Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, 04.06.2019r. Wstępna charakterystyka fizykochemiczna piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa* i jej interakcje z komórkami bakteryjnymi i eukariotycznymi.
7. Nagroda Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska podczas X Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, 04.06.2019r. Wstępna charakterystyka fizykochemiczna piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa* i jej interakcje z komórkami bakteryjnymi eukariotycznymi.
8. Wyróżnienie za najlepsze doniesienie ustne podczas IV studenckiej Konferencji Biologii Medycznej „Biofuzje", Warszawa, 24-26.05.2019r. Rola MUC5AC i determinantów LeX lub LeY w adhezji *H. pylori* do komórek nabłonka żołądka
9. I miejsce za najlepsze doniesienie plakatowe podczas IV studenckiej Konferencji Biologii Medycznej „Biofuzje", Warszawa, 24-26.05.2019r. Wytwarzanie cytokin prozapalnych przez monocyty THPXBlue™ w odpowiedzi na stymulację sekwencją peptydową wspólną dla ludzkiego białka Hsp60 HspB *H.pylori.*
10. Wyróżnienie za najlepsze doniesienie plakatowe podczas konferencji Postępy w Naukach Biomedycznych, Warszawa, 1-2.12.2018r. Warszawa Kompleks M3C – nowy preparat biologiczny o potencjalnym działaniu terapeutycznym.
11. Pierwsza nagroda za wystąpienie ustne podczas 13th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections. Konventum, Helsingør, Dania, 04-07.07.2018r**.** Deepening the harmful effect of *Helicobacter pylori* compounds on gastric barierr by 7-ketocholesterol, acetylsalicylic acid and endogemous factors in the light od increased risc of coronary heart disease.

12. Pierwsza nagroda za wystąpienie ustne podczas konferencji Postępy w Naukach Biomedycznych, Warszawa, 16-17.12.2017r. Warszawa. MPO. IL-33 i MMP-9 jako markery uszkodzenia błony śluzowej żołądka w zakażeniu *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowej. Postępy w badaniach biomedycznych.
13. Wyróżnienie za najlepsze doniesie nie plakatowe podczas konferencji Postępy w Naukach Biomedycznych, Warszawa, 16-17.12.2017r. Warszawa. Ocena właściwości immunomodulujących kompleksu melaniny z jonami miedzi (II) i ceftazydymem (M3C).
14. Pierwsza nagroda za najlepsze doniesienie plakatowe podczas XXI Sympozjum Postępy w Medycynie Zakażeń. Warszawa 8-9.12.2017r. Potencjał pro-regeneracyjny i immunomodulatorowy oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu linolowego wobec pałeczek *H. pylori*-badania *in vitro.*
15. Druga nagroda w sesji plakatowej podczas XX Sympozjum Postępy w medycynie zakażeń. Warszawa 2-3.12.2016r. Testy inwazyjne i nieinwazyjne w diagnostyce zakażeń *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowej.
16. Trzecia nagroda Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów za plakat podczas XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Bydgoszcz, 25-27.09.2016r. Histologiczne wyznaczniki miejscowej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka u kawii domowych zakażonych eksperymentalnie *Helicobacter pylori.*
17. Pierwsza nagroda za wystąpienie ustne podczas konferencji Internationational Medical Congress, Lublin. 11-13.03.2016r. Determinants of *Helicobacter pylori* inflammatory response in guinea pig model.
18. Wyróżnienie za działalność studencką na rzecz UŁ w roku akademickim 2013/2014.
19. Wyróżnienie za najlepsze wystąpienie ustne podczas konferencji Interdyscyplinarność – przyszłością nauki, 30.05.2014r. Kielce. Oszukanie układu odpornościowego – czyli rola mimikry molekularnej w reaktywnym zapaleniu stawów.
20. Wyróżnienie za szczególne zaangażowanie w działania promujące Wydział BiOŚ UŁ w roku akademickim 2013/2014.

Źródła finansowania

Dotacja celowa na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznana przez Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ w latach:

rok 2017 – B1711000001545.02

rok 2018 – B1811000001830.02

rok 2019 – B1911000002123.02

Streszczenie w języku polskim

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 będący następstwem zakażenia *H. pylori* wraz z komponentami tych bakterii przyczynia się do rozwoju procesów patologicznych w nabłonku żołądka. Wiedza na temat roli komponentów *H. pylori* w destabilizacji bariery nabłonkowej żołądka oraz ich oddziaływania na komórki odpornościowe jest niewystarczająca. Jej pogłębienie jest niezbędne do zrozumienia patogenezy zakażeń *H. pylori*, ich zróżnicowanego przebiegu, poszukiwania wyznaczników reakcji zapalnej i odpornościowej, które będą pomocne w opracowaniu zaawansowanej diagnostyki, skutecznych sposobów leczenia oraz immunoprofilaktyki takich zakażeń.

Celem pracy była ocena oddziaływania pałeczek *H. pylori* i zdefiniowanych komponentów tych bakterii na barierę nabłonkową żołądka, w zakresie kolonizacji i utrwalenia zakażenia, destabilizacji bariery nabłonkowej żołądka a także ingerencji w procesy naprawcze. Rozważając ogólnoustrojowe konsekwencje zakażenia *H. pylori* wzięto pod uwagę możliwości indukowania przez pałeczki *H. pylori* wytwarzania przeciwciał potencjalnie autoreaktywnych w następstwie mimikry antygenowej. Cele pracy realizowano w badaniach *in vivo* na modelu doświadczalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych oraz w badaniach *in vitro* na modelach komórkowych: pierwotnych komórkach nabłonkowych żołądka oraz fibroblastach tych zwierząt.

Wykazano znaczenie mucyny MUC5AC pokrywającej komórki nabłonkowe żołądka i wchodzące w jej skład determinanty LeX i LeY w procesie kolonizacji *H. pylori.* Efektem ekspozycji komórek bariery nabłonkowej żołądka na te bakterie lub ich rozpuszczalne komponenty, był wzrost wytwarzania MUC5AC i ekspozycji determinantów LeX i LeY, w powiązaniu z nasileniem adhezji pałeczek *H. pylori*, co może sprzyjać rozwojowi infekcji przewlekłej. Można sugerować, iż modulacja wytwarzania mucyny i determinantów LeX/LeY w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* stanowi mechanizm przystosowawczy tych bakterii umożliwiający rozwój i utrwalenie zakażenia oraz przewlekłej odpowiedzi zapalnej, która zaburza homeostazę bariery nabłonkowej żołądka. Reakcja ta we wczesnym etapie zakażenia charakteryzuje się infiltracją nabłonka żołądka przez granulocyty w tym eozynofile, przy jednoczesnym zmieszeniu ich liczby na obwodzie, a także limfocyty T CD4+. W późnym etapie zakażenia w tkance żołądka gromadzą się limfocyty T CD8+ oraz

tworzą się pęcherzyki limfocytarne. Reakcji zapalnej indukowanej przez pałeczki *H. pylori* i ich rozpuszczalne komponenty towarzyszy nasilony stres oksydacyjny w powiązaniu ze wzrostem odsetka komórek ulęgających apoptozie. Proces ten ulega nasileniu w środowisku egzogennej metaloproteinazy 9 (MMP-9), której źródłem *in vivo* są komórki gospodarza eksponowane na komponenty tych bakterii. W odpowiedzi na zaburzenie integralności bariery nabłonkowej będącej następstwem ubytku komórek ulegających apoptozie, inicjowane są procesy naprawcze, w których pośredniczy IL-33. Cytokina ta stymuluje migrację oraz proliferację komórek nabłonkowych, w powiązaniu z hamowaniem apoptozy komórek. Wykazano, że podczas zakażenia białko HspB *H. pylori* indukuje przeciwciała krzyżowo-reagujące z ludzkim białkiem Hsp60 i wspólną sekwencją aminokwasową obu tych białek. Istotnie podwyższony poziom takich przeciwciał u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca zakażonych *H. pylori* może wskazywać na ogólnoustrojową konsekwencją zakażenia. Na modelu kawii domowych potwierdzono znaczenie eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* w indukcji takich przeciwcia

Streszczenie w języku angielskim

Helicobacter pylori bacteria are the main etiological agent of gastritis in humans, which can lead to the development of gastric or duodenal ulcers and even gastric cancer. Chronic inflammation resulting from *H. pylori* infections thought to contribute to the development of pathological processes, locally in the gastric mucosa and potentially also systemically. Knowledge about the role of *H. pylori* components in the destabilization of the gastric epithelial barrier as well as impact of on immune cells is insufficient. It is deepening is necessary to understand the pathogenesis of *H. pylori* infections, their diverse course, searching for determinants of inflammatory and immune responses that will help to develop of advanced diagnostic procedures, effective treatments and immuneprophylaxis of such infections.

The aim of the study was to assess the impact of *H. pylori* and their defined components on the gastric epithelial barrier in terms of colonization and maintenance of infection, disintegration of this barrier, as well as interference with the repair processes. When considering the systemic consequences of *H. pylori* infection, the possibility of *H. pylori* rods to induce the production of potentially autoreactive antibodies due to antigenic mimicry was considered. The aims of the study were carried out *in vivo* using experimental model of *H. pylori* infection in *Caviae porcellus* (guinea pigs) and *in vitro* on cellular models of primary gastric epithelial cells and fibroblasts of these animals.

The significance of gastricmucineMUC5AC and Lewis determinants, LeX and LeY, in the colonization of gastric epithelial cells by *H. pylori* has been demonstrated. The exposure of gastric epithelial barrier to these bacteria or their components resulted with an increase in the production of mucin and LeX as well as LeY determinants, in conjunction with increased adhesion of *H. pylori*. It can be suggested that the modulation of mucin production, in conjunction with LeX/LeY determinants, in response to *H. pylori* infection is and adaptive mechanism for these bacteria to enable infection to develop and persist. *H. pylori* induce a chronic inflammatory response that brakes the gastric epithelial barrier homeostasis. This reaction at the early stage of infection is characterized by infiltration of gastric epithelium by granulocytes, including eosinophils, while reducing their peripheral number, as well as CD4 + T cells. At a late stage of infection, CD8 + T cells accumulate in the gastric tissue and lymphoid follicles are formed. The inflammatory reaction induced by

H. pylori and their soluble components is accompanied by increase oxidative stress, in association with an increase in the percentage of cells undergoing apoptosis. This process is intensified in the milieu of exogenous metalloproteinase 9 (MMP-9), which *in vivo* is delivered by immunocompetent cells of the host, mainly granulocytes, infiltrating the inflammatory zone. In response to the disruption of epithelial barrier integrity, as a result of the loss of cells undergoing apoptosis, IL-33-mediated repair processes are initiated. This cytokine stimulates epithelial cell migration and proliferation in association with inhibition of apoptosis. During *H. pylori* infection, immune processes are initiated. The heat shock protein (Hsp) B of these bacteria has been shown to induce the cross-reactive antibodies to the human Hsp60 protein and the common amino acid sequence of both of these proteins. Significantly elevated levels of such antibodies in patients with coronary heart disease, infected with *H. pylori*, may indicate systemic consequences of infection.

Wykaz stosowanych skrótów

ADCC *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*
cytotoksyczność zależna od przeciwciał

AlpA/B *adherence-associated lipoprotein A/B*
lipoproteina A lub B związana z adhezją

APC *antigen presenting cells*
komórka prezentująca antigen

aPKC *protein kinase*
kinaza proteinowa

ATCC *American Type Culture Collection*
Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych

ATP *adenosine-5'-triphosphate*
adenozynotrójfosforan

ATPaza *adenosine triphosphatase*
adenozynotrójfosfataza

ASPP2 *Apoptosis-stimulating of p53 protein 2*
białko 2 p53stymulujące apopptozę

BabA *blood group binding adhesin*
adhezyna wiążąca antygeny grup krwi

BPI *bactericidial/permeability increasing protein*
komórkowe białko zwiększające przepuszczalność błony

CagA *cytotoxin-associated gene A antigen*
białko związane z cytotoksyną

cagA *cytotoxin-associated gene A*
gen kodujący białko CagA

CD *cluster of differention*
kompleks różnicowania

CFU *colony-forming unit*
jednostka tworząca kolonię

ChNS *cardiovascullar disease*
choroba niekrwienna serca

CLR *C-type lectin receptors*
receptory lektynowe typu C

cRPMI *complete RPMI-1640*
pełne podłoże hodowlane RPMI-1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie surowicy oraz 1% standardowych antybiotyków

CTL *cytotoxic-T lymphocyte*
limfocyt T cytotoksyczny

CXCR *CXC chemokine receptor*
receptor chemokiny CXC

DAMPs *damage-associated molecular patterns*
wzorce molekularne związane z uszkodzeniem

DAPI *4',6-diamidino-2-phenylindole*
4',6'-diamidyno-2-fenyloindol

DC *dendritic cell*
komórka dendrytyczna

DC-SIGN *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*
nieintegryna swoista dla komórek dendrytycznych wiążąca ICAM-3

FBS *fetal bovine serum*
płodowa surowica bydlęca

EG *glycine acid extract (GE)*
ekstrakt glicynowy

EGF *epidermal growth factor*
naskórkowy czynnik wzrostu

ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*
test immunoenzymatyczny fazy stałej

ERK *extracellular signal-regulated kinase*
kinaza białkowa regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe

FITC *fluorescein isothiocyanate*
izotiocyjanian fluoresceiny

FGF *fibroblast growth factor*
czynnik wzrostu fibroblatów

FlaA/B *flagellar proteins: A and B*
białka flagelinowe: podjednostki A i B

GlcNAc *N-acetylglucosamine*
N-acetyloglukozamina

GM-CSF *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

GROα *growth-related oncogene α*
onkogen α stymulujący wzrost czerniaka

GTP *Guanosine-5'-triphosphate*
Guanozyno-5′-trifosforan

GTP-azy guanosine-5'triphosphatase
guanozyno-5'trifosfataza

HP-NAP *neutrophil-activating protein*
białko aktywujące neutrofile

HDL *high density lipoprotein*
lipoproteina wysokiej gęstości

HLO *Helicobacter-like organisms*
Helicobacter podobne organizmy

HMGB1 *high mobility group box protein-1*
białko dużej mobilności B-1

Hop *Helicobacter outer membrane proteins*
białka błony zewnętrznej *Helicobacter*

HpaA/B *H. pylori adhesin A/B*
adhezyna A/B *H. pylori*

Hsp *heat shock protein*
białko szoku cieplnego

IARC *International Agency for Research on Cancer*
Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem

ICAM *intercellular adhesion molecule*
cząsteczka przylegania międzykomórkowego

IFN *interferon*
interferon

Ig *immunoglobulin*
przeciwciało (immunoglobulina)

IKKε *inhibitor of kappa light polypeptide enhancer in B-cells, kinase gamma*
inhibitor kappa wzmacniacza genu lekkego polipeptydu w komórkach B kinazy gamma

IL *interleukin*
interleukina

IDA *iron de- ficiency anemia*
niedokrwistośc z niedoboru żelaza

ITP *primary immunologic thrombocytopenia*
pierwotna małopłytkowość immunologiczna

iNOS *inducible nitric oxide synthases*
indukowalna syntaza tlenku azotu

IPP *proton-pomp inhibitor*
inhibitor pompy protonowej

IRF *IFN regulatory factor*
czynnik regulacyjny genu kodującego interferon

IRAK *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*
receptor dla interlekiny 1 związany z kinazą 1

ISGF *IFN-stimulated gene factor*
gen stymulowany przez interfon

LAL *Limulus Amebocyte Lisate*
chromogenny test wykorzystujący lizaty amebocytów hemolimfy krzypłoczy do badania endotoksyn bakteryjnych

LBP *lipopolysaccharide binding protein*
białko wiążące lipopolisacharyd

Le *Lewis antigen blood group*
antygen grupowe krwi Lewis

LPS *lipopolysaccharide*
lipopolisacharyd

MALT *mucosa-associated lymphoid tissue*
tkanka limfatyczna błon śluzowych

MAP *mitogen-activated protein*
białko aktywowane przez miogen

MARK *miogen-activated protein kinase*
kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MBL *mannose-binding lectin*
lektyna wiążąca mannozę

MBC *blood mononuclear cell*
komórka jednojądrzasta krwi

MC *mast cells*
mastocyty (komórki tuczne)

MCL1 *antiapoptotic protein*
białko antyapoptotyczne

MCP-1 *monocyte chemoattractant protein-1*
białko-1 przyciągające monocyty

MD-2 *myeloid differentiation-2*
białko kompleksu receptorowego TLR4

MEK-1 *mitogen-activated protein kinase kinase*
białko kinazy kinaz aktywowane mitogenem

MHC *major histocompatibility complex*
główny układ zgodności tkankowej

MIF *macrophage migration inhibitory factor*
czynnik zahamowania migracji makrofagów

MIP-1α *macrophage inflammatory protein-1 alpha*
białko-1α zapalne makrofagów

MPO *mieloperoksydase*
mieloperoksydaza

mRNA *messenger* RNA
informacyjny RNA

MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
sól tetrazolowa

MUC *mucin*
mucyna

NADPH *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NAP *neutrophil-activating protein*
białko aktywujące neutrofile

NFAT *nuclear factor of activated T cells*
jądrowy czynnik aktywowanych komórek T

NF-Y *nuclear factor Y*
jądrowy czynnik transkrypcyjny Y

NF-κB *nuclear factor κB*
jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

NK *natural killer*
naturalna komórka cytotoksyczna

NLR NOD, *nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor*
receptor NOD-podobny (domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotyd)

NO *nitric oxide*
tlenek azotu

OipA *outer inflammatory protein A*
zewnętrzne białko zapalne A

OMP *outer membrane protein*
białko błony zewnętrznej

OMV *outer membrane vesicles*
pęcherzyki błony zewnętrznej

PAI-2 *plasminogen activator inhibitor*
inhibitor aktywatora plazminogenu

PAMPs *pathogen-associated molecular patterns*
molekularne wzorce związane z patogenami

PAR *protease-activeted receptor*
receptor aktywujący proteazę

PBML *peripheral blood-mononuclear leukocyte*
leukocyt jednojądrzasty krwi obwodowej

PCR *polymerase chain reaction*
reakcja łańcuchowej polimerazy

PG *prostaglandin*
prostaglandyna (np. prostaglandyna 2, PGE_2)

PGN *peptidoglycan*
peptygoglikan

PHA *phytohaemagglutinin*
fitohemaglutynina

PI3-K phosphoinositide 3-kinase
kinaza 3 fosfatydyloinozytolowa

PPI *proton-pump inhibitors*
inhibotory pompy protonowej

PKC *protein kinase C*
kinaza białkowa C

PLC *phospholipase C*
fosfolipaza C

PRR *pattern recognition receptor*
receptor rozpoznający wzorce

Rab7 *Ras-related protein 7*
białko związane z Ras

RICK *serine-threonine kinase*
kinaza serynowo-treoninowa

RLR RIG, *retinoic acid-inducible gene-I-like receptor*
receptor RIG-I-podobny

ROS *reactive oxygen species*
reaktywne formy tlenu

rRNA *ribosomal ribonucleid acid*
rybosomalny kwas rybonukleinowy

RT-PCR *reverse transcription polymerase chain reaction*
reakcja łańcuchowaj polimerazy z odwrotną transkrypcją

RUT *rapid urease test*
szybki test ureazowy

RZS *rheumatoid arthritis*
reumatoidalne zapalenie stawów

SabA *sialic acid binding adhesin*
adhezyna wiążąca kwas sjalowy

SAT *stool antigen test*
test do wykrywania antygenów w kale

SD *standard deviation*
odchylenie standardowe

SH2 *src homology domain 2*
domena fosfatazy tyrozynowej SHP-2

SHP *Src homology region 2 domain-containing phosphatase*
fosfataza tyrozynowa

sLe *sialyl Lewis antigen*
sjalowany antygen Lewis

SOD *superoxide dismutase*
dysmutaza nadtlenkowa

Src *Src family kinase*
rodzina kinaz tyrozynowych

STAT *signal transducer and activator of transcription*
przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji

T4SS *type IV secretion system*
system sekrecji typu IV

TF *tissue factor*
czynnik tkankowy

TGF *transforming growth factor*
transformujący czynnik wzrostu

Th *T helper cells*
limfocyty T pomocnicze

TIR *Toll-IL-1 receptor*
reptor Toll inteleukiny 1

TLR *Toll-like receptor*
receptor Toll-podobny

TNF *tumor necrosis factor*
czynnik martwicy nowotworu

TRAF3 *TNF receptor–associated factor 3*
czynnik 3 związany z receptorem TNF

Treg *regulatory T cell*
limfocyt T regulatorowy

TRIAL *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
związany z TNF ligand indukujący apoptozę

UBT *urea breath test*
ureazowy test oddechowy

UreA/B/C *subunits of urease:A, B and C*
podjednostki ureazy: A, B i C

VacA *vacuolating cytotoxin A*
cytotoksyna wakuolizująca A

VEGF *vascular endothelial growth factor*
czynnik wzrostu śródbłonka naczynowego

WHO *World Health Organization*
Światowa Organizacja Zdrowia

ZO-1 *zona occludens protein-1*
zonulina (białko połączeń ścisłych)

Wprowadzenie

Rys historyczny

Pierwsze wzmianki o zaburzeniach żołądkowych u ludzi, których objawem było pieczenie w nadbrzuszu pochodzą z czasów Hipokratesa *(Kidd i Modlin 1998),* a prawdopodobnie pierwszy przypadek wrzodów żołądka został udokumentowany przez włoskiego lekarza Marcello Donati w 1586 roku *(Kidd i Modlin 1998).* W 1875 roku bakteriolodzy Bottcher i Letulle postawili hipotezę, że chorobę wrzodową żołądka mogą powodować bakterie, jednak nie zyskała ona wielu zwolenników, gdyż nie wyhodowano podejrzanego drobnoustroju i tym samym nie potwierdzono teorii o zakaźnym podłożu choroby *(Kidd i Modlin 1998)*. W 1889 roku Walery Jaworski opisał spiralne mikroorganizmy, które zaobserwował w osadzie z popłuczyn ludzkiego żołądka sugerując, że drobnoustroje mogą być przyczyną choroby wrzodowej żołądka *(Jaworski 1889).* Jednak zakaźny charakter choroby udowodnili dopiero w 1983 roku australijscy badacze, Barry Marshall i Robin Warren, izolując bakterie z bioptatów pobranych od pacjentów cierpiących na chorobę wrzodową żołądka. Opierając się na postulatach Kocha wyhodowali bakterie, którym nadano nazwę gatunkową *Helicobacter pylori.* Udowodnili, że są one czynnikiem etologicznym choroby wrzodowej żołądka *(Warren i Marshall 1983).* Za to odkrycie w 2005 roku otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Badania zapoczątkowane przez Warrena i Marshalla, a następnie kontynuowane w wielu ośrodkach badawczych, zaowocowały postępem wiedzy na temat chorobotwórczości *H. pylori,* jednak znajomość patogenezy tych zakażeń, patofizjologii inicjowanej przez nie reakcji zapalnej oraz procesów odpornościowych wciąż jest niewystarczająca. Nie wiadomo, dlaczego zakażenia wywołane przez *H. pylori* mają zróżnicowany przebieg, począwszy od zakażeń bezobjawowych, poprzez wrzody żołądka lub dwunastnicy, a także raka żołądka lub chłoniaka.

Charakterystyka H. pylori

H. pylori to Gram-ujemne, mikroaerofilne, biegunowo urzęsione pałeczki, które po raz pierwszy zostały wyizolowane przez Warrena i Marshalla w 1983, roku z błony śluzowej żołądka pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym tego narządu *(Warren i Marshall 1983).* Początkow nazwa tych bakterii to *Campylobacter pyloroi*

lub *C. pylori*. W 1989 roku na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA *(ribosomal rybonucleic acid)* badanych izolatów i *Campylobacter* spp. utworzono nowy rodzaj *Helicobacter (Brzozowski 2006).* Ostateczna klasyfikacja pałeczek *H. pylori* przedstawia się następująco: *(Marshall i Warren 1994).*

KRÓLESTWO:	*Bacteria*
TYP:	*Proteobacteria*
KLASA:	*Epsilon Proteobacteria*
RZĄD:	*Campylobacterales*
RODZINA:	*Helicobacteraceae*
RODZAJ:	*Helicobacter*
GATUNEK:	*H. pylori*

Do tej pory opisano ponad 30 gatunków z rodzaju *Helicobacter*, które ze względu na cechy morfologiczne, właściwości biochemiczne i miejsce kolonizacji zostały podzielone na dwie grupy: gatunki żołądkowe oraz wątrobowo-jelitowe.

Bakterie te należą do klasy *Epsilon Proteobacteria,* a ich wielkość waha się od 2-5 µm długości i 0,5-1 µm szerokości *(Rybicka i wsp. 2010).* Mogą występować w formie spiralnej lub S-kształtnej i dzięki rzęskom umieszczonym na jednym z biegunów mogą penetrować gęsty śluz wydzielany przez komórki nabłonkowe żołądka, przemieszczać się w przestrzeniach międzykomórkowych, oraz wiązać się do powierzchni komórek *(Rudnicka i wsp. 2014).* W niekorzystnych warunkach, lub też przy długotrwałej hodowli, formy pałeczkowate *H. pylori* mogą przekształcać się w formy ziarniakowate, które przez pewien czas zachowują podstawowe funkcje życiowe, a z czasem ulegają degeneracji *(Bode i wsp. 1993).* Pałeczki *H. pylori* mają duże wymagania wzrostowe, na które składają się: wysoka wilgotność (95%) i zawartość w atmosferze 10%CO_2 oraz 85%N_2, temperatura wzrostu 37°C, a także pH w zakresie 5,5-8,0 *(Scott i wsp. 2002).* Hodowla *H. pylori* wymaga podłóż wzbogaconych w krew owczą i/lub surowicę oraz suplementów zawierających witaminy. Do rutynowej hodowli i izolacji *H. pylori,* powszechnie stosowane są podłoża stałe typu Columbia lub *Brucella,* uzupełnione pełną lub zlizowaną krwią końską lub owczą lub alternatywnie, płodową surowicą bydlęcą - FBS *(fetal bovine*

serum). Często stosowany tzw. suplement „Dent" zawiera wankomycynę, trimetoprim, cefsoludynę i amfoterycynę B podczas gdy suplement „Skirrow" składa się z wankomycyny, trimetoprimu, polimyksyny B i amfoterycyny B *(Skirrow 1977; Dent i wsp. 1988).* Płynne podłoża do hodowli to zazwyczaj bulion *Brucella* lub Mueller-Hinton, zawierające 2 do 10% FBS lub 0,2 do 1,0% β-cyklodekstryny, często łączone z suplementem „Dent" lub „Skirrow". Takie wymagania odżywcze związane są z miejscem bytowania pałeczek *H. pylori* w żołądku gdzie jest niewielka dostępność tlenu na powierzchni komórek nabłonkowych, w części przedodźwiernikowej żołądka *(Bury-Moné i wsp. 2006).* Ponadto *H. pylori,* choć są wrażliwe na zmienne warunki zewnętrzne, mogą przeżywać w kwaśnym środowisku żołądka, które ulega alkalizacji wskutek aktywności wydzielanej przez te bakterie ureazy *(Jiang i Doyle 1998).*

Epidemiologia zakażeń H. pylori

Pałeczki *H. pylori* powszechnie występują u ludzi, choć wykazano znaczne zróżnicowanie i częstość zakażeń w poszczególnych krajach, grupach etnicznych i społecznych *(Beswick i wsp. 2006; Nikoronow i wsp. 2008; Karczewska i wsp. 2009).* Głównym rezerwuarem tych bakterii są ludzie, choć przypuszcza się, że mogą nim być także zwierzęta mające kontakt z ludźmi (psy, koty, świnie, małpy) *(Dore i wsp. 2001; Brown i wsp. 2002).* Do zakażeń dochodzi drogą ustno-ustną, kałowo-ustną lub żołądkowo-ustną, a ich częstość zależy do warunków społeczno-ekonomicznych i sanitarnych danego kraju *(Allaker i wsp. 2002; Vale i Vitor 2010).* Za czynniki sprzyjające szerzeniu się zakażeń *H. pylori* uznaje się niedożywienie oraz niedobór witamin w diecie *(Karczewska i wsp. 2009; Ryu i wsp. 2010).* W krajach rozwiniętych, zakażenie *H. pylori* występuje u 20 do 40% populacji, natomiast w krajach o niskim stanie sanitarno-epodemiologicznym odsetek zakażeń może wynosić nawet od 80 do 100% *(Malaty i wsp. 1994).* Do zakażenia *H. pylori* dochodzi we wczesnym okresie życia i jeśli nie jest ono leczone może utrzymywać się przez wiele lat, a nawet całe życie osobnicze *(Fiedorek i wsp. 1991; Perez i wsp. 2004; Karczewska i wsp. 2009)*. Przewlekły charakter zakażeń *H. pylori* przyczynia się do powstania zmian chorobowych, które związane są z nieskutecznymi mechanizmami efektorowymi odpowiedzi odpornościowej gospodarza m.in. w następstwie mimikry molekularnej

(Appelmelk i wsp. 1997; Matusiak i wsp. 2016; Chmiela i Gonciarz 2017; Chmiela i wsp. 2019). Pałeczki *H. pylori* posiadają wiele czynników wirulencji m.in. ureazę, białko CagA (*cytotoxin-associated gene A antigen*) i toksynę wakuolizującą - VacA (*vacuolating cytotoxin A*), właściwości adhezyjne, system sekrecyjny typu IV-T4SS *(type IV secretion system),* lipopolisacharyd - LPS *(lipopolysaccharide),* o właściwościwościach immodulujących *(Chmiela i wsp. 2014; Chmiela i Kupcinskas 2019).* Unikanie odpowiedzi odpornościowej gospodarza skutkuje inicjacją przewlekłego stanu zapalnego w błonie śluzowej żołądka i dwunastnicy oraz wrzodów tych narządów. Światowa Organizacja Zdrowia - WHO *(World Health Organization)* sklasyfikowała zakażenie *H. pylori* jako karcinogen klasy I, ponieważ zwiększa ono ryzyko wystąpienia raka żołądka i drobnokomórkowego chłoniaka tkanki limfatycznej - MALT *(mucosa-associated lymphoid tissue)* o niskim stopniu złośliwości *(Wróblewski i wsp. 2010).* Zarówno mechanizm zakażenia, jak i wzajemne interakcje gospodarz-patogen wciąż są słabo poznane. Wiadomym jest, że na przebieg zakażenia *H. pylori* wpływa zarówno podatność osobnicza gospodarza, jak i zjadliwość szczepu *(Suerbaum i Josenhans 2007).* Długotrwała kolonizacja organizmu gospodarza przez pałeczki *H. pylori* prawdopodobnie może przyczyniać się do rozwoju ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej poza miejscem ich bytowania *(Tan i wsp. 2009; Wróblewski i wsp. 2009)*. Dlatego też sugeruje się, że przewlekłe zakażenie *H. pylori* może przyczyniać się do rozwoju chorób poza układem pokarmowym takich jak: choroba niedokrwienna serca - ChNS *(cardiovascullar disease),* niedowzrost u dzieci, reumatoidalne zapalnie stawów - RZS *(rheumatoid arthritis),* pierwotna małopłytkowość immunologiczna - ITP (*primary immunologic thrombocytopenia*), niedokrwistośc z niedoboru żelaza - IDA *(iron deficiency anemia),* niedobór witaminy B12, cukrzyca, zaburzenia dermatologiczne oraz neurologiczne *(De Block i wsp. 1999, 2008; Chmiela i wsp. 2003; Tamer i wsp. 2009; Tiwari i wsp. 2009; Arabski i wsp. 2010; El-Eshmawy i wsp. 2011; Chmiela i wsp. 2015; Stawerska i wsp. 2015).* Współudział komponentów bakteryjnych w etiologii chorób poza przewodem pokarmowym jest determinowany przez zjawisko mimikry antygenowej, którą definuje się jako podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pomiędzy strukturami II-rzędowymi mikroorganizmu a cząsteczkami gospodarza, co w konsekwencji prowadzi do produkcji autorekatywnych przeciwciał, mogących przyczyniać się do rozwoju chorób o podłożu zapalanym i/lub

autoimmunologicznym. Takie podobieństwo może występować pomiędzy liniowymi sekwencjami aminokwasów, strukturą przestrzenną białek oraz jednocześnie sekwencją aminokwasową i budową przestrzenną *(Oldstone 1989; Quaratino i wsp. 1995; Chmiela i Gonciarz 2017).* Sugeruje się, że wiele podobieństw leży u podstaw zjawiska mimikry antygenowej pomiędzy komponentami gospodarza a *H. pylori* np: 686 aminokwas ATP-azy, VacA, łańcuch beta ureazy i $H^+ K^+$ -ATP- aza żołądkowa, białko szoku cieplnego - Hsp *(heat shock protein)* A i GroEs, HspB i Hsp60 gospodarza, hemaglutynina/proteaza i anhydraza węglanowa *(Negrini i wsp. 1991; Cover i wsp. 1994; Ge i wsp. 1995; Uibo i wsp. 1995; Melchers i wsp. 1996; Kansau i wsp. 1996; Claeys i wsp. 1998; Amadei i wsp. 2003; Guarneri i wsp 2005).* Jednak, uzyskanie odpowiedzi na pytania czy i jak często autoprzeciwciała indukowane w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* są zaangażowana w rożne procesy patologiczne wymaga dalszych badań. Przykłady komponentów gospodarza stanowiących potencjale tarcze dla przeciwciał anty-*H. pylori* wymieniono w **Tabeli 1.**

Tabela 1 *Przykłady możliwych zaburzeń autoimmunologicznych warunkowanych mimikrą molekularną między H. pylori a komponentami gospodarza.*

Cel	Komponenta gospodarza	Komponenta bakterii	Jednostka chorobowa	Źródło
Żołądek	Antygeny Le Hsp60	LPS	Zapalnie błony śluzowej żołądka	*Negrini i wsp. 1991; Monterio i wsp. 1998;*
Komórki okładzinowe	ATP-aza H/K+	ATP-aza H/K+	Zapalenie żołądka Niedokrwistość złośliwa	*Ge i wsp. 1995; Melchers i wsp. 1996; Claeys i wsp. 1998; Amadei i wsp. 2003*
Trzustka	Anhydraza węglanowa Ligaza E3	Alfa anhydraza węglanowa PBP	Insulinooporność	*De Block i wsp. 1999; 2008; Guarneri i wsp. 2005; El-Eshmawy i wsp. 2011*
Śródbłonek	Antygeny Le Hsp60 CCRL1	LPS HspB Ureaza	Choroba niedokrwienna serca	*Chmiela i wsp. 2003; Tamer i wsp. 2009; Arabski i wsp. 2010; Matusiak i wsp. 2016*
Płytki krwi	Antygeny Le I i II glikoproteina	LPS CagA	Małopłytkowość	*Tiwari i wsp. 2009*
Czynniki humoralne	Peptydy regulujące apetyt Wybrane cytokiny	LPS	Niedowzrost	*Stawerska i wsp. 2015.*

CagA- białko cytotoksyczne związane z genem A, CCRL1- receptor chemokin typu 1, Hsp-białko szoku cieplnego, Le-determinanta antygenowa Lewis, LPS-lipopolisacharyd, PBP-białko wiążące penicylinę

Rozpowszechnienie zakażeń *H. pylori* wśród populacji ludzkiej, ich przewlekły charakter, oraz poważne konsekwencje zakażenia były przesłanką do opracowania zestawu testów diagnostycznych, mających na celu potwierdzenie/wykluczenie zakaźnego podłoża zapalenia błony śluzowej żołądka, wrzodów żołądka i dwunastnicy, a także raka żołądka.

Diagnostyka zakażeń H. pylori

W diagnostyce zakażeń *H. pylori* stosowane są metody inwazyjne lub nieinwazyjne. Testy inwazyjne oparte są na pobraniu wycinków tkanki żołądka do badania histopatologicznego, a także założenia hodowli i wykonania tzw. „szybkiego testu urazowego". Dla porównania do testów nieinwazyjnych pobierana jest krew lub kał w celu wykrycia, odpowiednio swoistych przeciwciał przeciwbakteryjnych lub antygenów *H. pylori*. Wybór konkretnego testu dla indywidualnego pacjenta zależy od objawów klinicznych, wieku a także czułości i swoistości testów *(Varia 1990; Logan 1998).* W protokołach badawczych często stosuje się połączenie obu typów testów. Do rutynowych celów diagnostycznych najczęściej stosuje się badanie histopatologiczne, szybki test urazowy, ureazowy test oddechowy oraz badanie mikrobiologiczne. Natomiast badania serologiczne stosuje się w celach epidemiologicznych lub jako uzupełnienie rutynowej diagnostyki. Wg niektórych źródeł, u dzieci testy diagnostyczne na obecność antygenów *H. pylori* w kale dają możliwość oceny zakażenia bez potrzeby wykonania endoskopii *(Bąk-Romaniszyn i Małecka-Panas 2007).* Według ustaleń podjętych w 2002 roku przez European Consensus Group - ECG w Maastricht do potwierdzenia zakażenia *H. pylori* powinny być stosowane: urazowy test oddechowy ^{13}C - UTB *(urea breath test)* oraz preparat histopatologiczny z wycinka błony śluzowej żołądka *(Malfertheiner i wsp. 2002).* Wytyczne dotyczące diagnostyki zakażeń *H. pylori* są cyklicznie weryfikowane przez ECG.

Metody inwazyjne

Ten rodzaj testów oparty jest na pobraniu podczas gastroskopii 5-7 bioptatów z części przedodźwiernikowej i trzonu żołądka. Materiał biologiczny wykorzystywany jest do wykonania badania histopatologicznego oraz szybkiego testu urazowego - RUT *(rapid urease test),* założenia hodowli, a niekiedy także do

identyfikacji specyficznych sekwencji DNA *H. pylori* z wykorzystaniem techniki łańcuchowej reakcji polimeracy-PCR *(polymerase chain re action)* (*Urban 2010).*

RUT - jest prostym i szybkim testem służącym do wykrywania aktywności ureolitycznej pałeczek *H. pylori* w pobranym bioptacie *(Dzieniszewski i Jarosz 2004).* Tkankę żołądka umieszcza się w podłożu zawierającym mocznik i wskaźnik pH – fenyloalaninę (wrażliwą na zmianę pH). O wyniku dodatnim testu świadczy zmiana zabarwienia podłoża z żółtego na różowe, w wyniku alkalizacji środowiska pod wpływem amoniaku pochodzącego z rozkładu ureazy. Fałszywie dodatnie wyniki tego testu można otrzymać, odczytując wyniki po czasie dłuższym niż 24 godziny lub też z powodu występowania w bioptacie mikroflory towarzyszącej np. *Pseudomonas aeruginosa* o aktywności ureolitycznej *(Levin i wsp. 2007).* Fałszywie ujemne wyniki obserwuje się u pacjentów z czynnym lub niedawno przebytym krwawieniem z górnego odcinka przewodu pokarmowego, jeśli w treści żołądkowej znajduje się domieszka krwi, a także u chorych leczonych inhibitorami pompy protonowej, antagonistą receptora H_2, antybiotykami lub preparatem bizmutu. Czułość testu wynosi około 90%, natomiast jego specyficzność 93% *(Deroń i Kieć-Świerczyńska 2002).*

Hodowla - *H. pylori* jest drobnoustrojem wymagającym, rosnącym na bogatych selektywnych podłożach (z dodatkiem krwi owczej i/lub surowicy, oraz czynnikiem hamującym wzrost mikroflory towarzyszącej), w warunkach mikroaerofilnych (w atmosferze 10%CO_2, wilgotności 95% i temperaturze 37ºC). Odczytu dokonuje się do 7 dni po założeniu hodowli *(Al-Sulami i wsp. 2008).* Następnie wykonuje się preparat barwiony metodą Grama oraz testy biochemiczne potwierdzające: wytwarzanie ureazy na podłożu Christensena z mocznikiem, a także katalazy i oksydazy. Swoistość metody hodowli wynosi 100%, natomiast czułość tylko 50%, ponieważ mimo obecności bakterii w badanym materiale, ze względu na ich niewielką ilość i wysokie wymagania wzrostowe, często nie udaje się ich wyhodować.

Badanie histopatologiczne – preparat cienkowarstwowy przygotowywuje się z fragmentu tkanki pobranej z części przedodźwiernikowej żołądka, który poddaje rutynowej obróbce histologicznej. Skrawki barwi się metodą wg Giemsy celem wykrycia organizmów *Helicobacter*-podobnych - HLO *(Helicobacter-like organisms)* , a

przedostaje się do krwi i wraz z nią do płuc skąd wydalony drogą oddechową do naczynia diagnostycznego. Ocena wyniku polega na pomiarze, w wydychanej mieszaninie gazów, znakowanego węgla na podstawie aktywności promieniotwórczej w przypadku $^{14}CO_2$ lub analizy z użyciem spektrometrii mas w przypadku $^{13}CO_2$ *(Urban 2010*). UBT charakteryzuje się czułością i specyficznością około 97%. Podczas wykonania testu niekiedy można otrzymać fałszywie ujemne wyniki, np. u pacjentów leczonych inhibitorami pompy protonowej, u chorych z zanikowym zapaleniem błony śluzowej żołądka, lub na skutek obecności świeżej krwi w żołądku *(Krogfelt i wsp. 2005; Dziurkowska-Marek i Marek 2008)*. Wykazano, że u małych dzieci, i pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi.

Test na obecność antygenów *H. pylori* w kale – testy z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych na obecność białkowych antygenów *H. pylori* w kale są stosowane do identyfikacji pierwotnego zakażenia *H. pylori*, jak oraz jsko badanie kontrolne zakończeniu leczenia *(Krzywicka 2010; Malfertheiner 2012).* Czułość i swoistość testu wynosi około 92% natomiast do spadku tych parametrów może przyczynić się złe przechowywanie próbki lub zbyt słaby słaby stopień kolonizacji nabłonka żołądka *(Wiśniewska 2002*; *Urban 2010).*

Metody serologiczne - opierają się głównie na ilościowym oznaczaniu przeciwciał klasy IgG *(immunoglobulin)* anty-*H. pylori*. Stosowane są trzy rodzaje testów serologicznych: immunoenzymatyczny test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay)*, Western bloting oraz testy aglutynacji *(Urban 2010).* Testy te nie mogą być wykorzystywane do oceny skuteczności leczenia, ponieważ przeciwciała nawet po eliminacji zakażenia *H. pylori* utrzymują się jeszcze przez jakiś czas w krążeniu *(Rechciński i wsp. 1997; Ho i Marshall 2000).* Z kolei fałszywie dodatnie wyniki w testach ELISA mogą być wynikiem podobieństwa antygenowego *H. pylori* i innych drobnoustrojów, np. *Escherichia coli, Campylobacter jejuni* czy *Heamophilus influenzae. (Jarosińska i wsp. 1999).* Ujemny wynik testu wyklucza zakażenie *H. pylori*. Czułość i swoistość testu mieści się w przedziale 80-84% *(Ho i Marshall 2000).*

Leczenie zakażeń H. pylori

W leczenieu zakażeń *H. pylori* stosuje się potrójną terapię złożoną z inhibitora pompy protonowej - PPI *(proton-pump inhibitors),* klarytromycyny i amoksycyliny /lub metronidazolu, która zwykle trwa 7 dni *(Malfertheiner i wsp. 2012; Chmiela i wsp 2018).*

Klarytromycyna do niedawna była sugerowana jako najskuteczniejszy pojedynczy antybiotyk w leczeniu zakażenia *H. pylori* (eradykacja 40% przy dawkowaniu leku dwa razy dziennie od 10 do 14 dni) *(Graham i wsp. 1993; Peterson i wsp. 1993; Megraud i wsp. 1995; Megraud i wsp. 2004.)* Monoterapia okazała się jednak mało efektywna, ze względu na miejsce bytowania bakterii (lepki śluz i niskie pH). W niektórych krajach zaczęto stosować podwójną terapię, która łączyła podanie PPI z amoksycyliną, dwa razy dziennie. Jednak ten typ terapii został wyparty przez potrójną procedurę łączącą podanie dwóch antybiotyków jednocześnie z PPI lub związkami bizmutu. Rosnąca oporność *H. pylori* na antybiotyki stosowane w potrójnej terapii skłoniła do opracowania tzw. terapii sekwencyjnej *(Gerrits i wsp. 2006; Tsugawa i wsp. 2011)*. Polega ona na przyjmowaniu przez pierwsze 5 dni PPI oraz amoksycyliny, następnie przez kolejne 5 dni PPI, klarytromycyny oraz tinidiazolu. Kolejną alternatywą są terapie, które łączą związki bizmutu, PPI i dwa antybiotyki *(Lambert i wsp. 1997, Malfertheiner i wsp. 2007*). Do antybiotyków najczęściej stosowanych w leczeniu zakażeń *H. pylori* należą tetracyklina, amoksycylina, imidazol (głównie metronidazol i tinidazol) oraz wybrane makrolidy (w szczególności klarytromycyna, czasami azytromycyna) *(Megraud i wsp. 2013).* Stosowanie ryfabutyny i furazolidonu ze względu na ograniczoną skuteczność leczenia i słabą tolerancję tych leków, uznawane jest za terapię alternatywną dla pacjentów, od których wyizolowano bakterie *H. pylori* oporne na metronizadol *(Xiao i wsp. 1990; Perri i wsp. 2000).* Bardzo rzadko stosuje się inne leki tj. ciprofloksacynę, pochodne fluorochinlonów, ryfampicynę i streptomycynę *(Malfertheiner i wsp. 2007, 2012; Megraud i wsp. 2013).* Wykazano, że wyżej wymienione antybiotyki były skuteczne w leczeniu zakażeń *H. pylori*, przy stałych wskaźnikach eradykacji wynoszących od 90 do 95%. Niepowodzenia terapii związane były z nieprzestrzeganiem zaleceń terapeutycznych, często z powodu działań niepożądanych, oraz z występowaniem oporności izolatów na antybiotyki. Oporność

jest powszechna u izolatów pochodzących od pacjentów, którzy przeszli wcześniej nieudaną terapię antybiotykową *(Megraud i wsp. 2004.)*

Profilaktyka

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się poszukiwaniu alternatywnych metod leczenia zakażeń *H. pylori* lub ich zapobieganiu, w szczególności szczepionkom. Potrzeba taka wynika z dużego rozpowszechnienia zakażeń *H. pylori* i wysokich kosztów leczenia chorób wywołanych przez ten drobnoustrój. W badaniach nad opracowaniem skutecznej szczepionki, skupiono się przede wszystkim na znalezieniu najlepszej drogi podania szczepionki, a także na opracowaniu antygenów i adiuwantów, które będą najsilniej indukowały odporność w miejscu bytowania bakterii - w błonie śluzowej żołądka. Wykazano, że antygeny *H. pylori* takie jak podjednostki ureazy - UreA i UreB, CagA, VacA oraz białko aktywujące neutrofile – NAP *(neutrophil-activating protein)* skutecznie pobudzają odpowiedź odpornościową i są rozpoznawane przez swoiste przeciwciała stanowiąc tym samym potencjalnie dobre składniki szczepionek *(Lepper i wsp. 2004; Yan i wsp. 2005).* Na modelu mysim wykazano, że połączenie ureazy z innymi antygenami np. adhezyną - HapA *(H. pylori adhesin A),* zapewnia lepszą ochronę przed zakażeniem *H. pylori,* co było związane z wytwarzaniem przeciwciał specyficznych wobec *H. pylori* i aktywacją odpowiedzi odpornościowej gospodarza typu komórkowego z udziałem limfocytów pomocniczych (T helper) Th1/Th2 *(Flach i wsp. 2011).* Innym nowatorskim rozwiązaniem jest system, w którym wirus odry jest używany jako wektor do ekspresji białka NapA *H. pylori*. Wykazano, że atenuowane szczepy wirusa odry wykazujące ekspresję antygenu NapA *H. pylori* indukują humoralną i komórkową odpowiedź gospodarza zarówno przeciwko antygenowi wirusa odry, jak i NapA *(Iankov i wsp. 2011).* Kolejnymi potencjalnymi składnikami szczepionek mogą być: CagA, VacA i NapA w połączeniu z wodorotlenkiem glinu jako adiuwantem. Wykazano, że taki preparat szczepionkowy podany drogą iniekcji domięśniowej, wywołuje odpowiedź humoralną i komórkową gospodarza zależną od limfocytów T CD4+, swoistych wobec antygenów *H. pylori (Malfertheiner i wsp. 2008).* Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że niektóre antygeny i kombinacje adiuwantów

mogą indukować ochronną odporność, chociaż jej mechanizmy nadal pozostają niewyjaśnione *(Rossi wsp. 2004; Jeremy i wsp. 2007; Chen i wsp. 2012).*

Charakterystyka najważniejszych czynników wirulencji H. pylori

H. pylori posiada liczne czynniki wirulencji, z których pewne są wysoce zmienne wskutek procesu zmienności fazowej i/lub mają różne, a czasem nawet przeciwstawne funkcje. Tak wysoka różnorodność czynników wirulencji w połączeniu z złożoną odpowiedzią odpornościową gospodarza sprawiają, że bardzo trudno jest jednoznacznie określić rolę pro- lub przeciwzapalną poszczególnych czynników wirulencji *H. pylori,* w przebiegu zakażenia.

- **Adhezyny i białka błony zewnętrznej**

Białka błony zewnętrznej – OMP *(outer membrane protein)* bakterii są klasyfikowane według ich funkcji i lokalizacji. Białka błonowe α-helikalne znajdują się w prawie wszystkich błonach bakterii Gram-ujemnych, natomiast białka błonowe typu β-beczułkowate, występują tylko w błonach zewnętrznych. Białka błony zewnętrznej typu β pełnią wiele funkcji, w tym rolę adhezyn. Importują również składniki odżywcze i wyciszają sygnały z otoczenia zewnętrznego. Wykazano, że w genomie *H. pylori* występują geny kodujące 32 białka OMP, za pomocą których bakterie przyłączają się do komórek nabłonka żołądka *(Exner i wsp. 1995; Alm i wsp. 2000).* Białka OMP *H. pylori* odgrywają rolę nie tylko w adhezji do komórek nabłonkowych żołądka ale również w poprawie translokacji CagA do tych komórek za pośrednictwem systemu sekrecyjnego typu 4- T4SS *(typ four secretion system).* Wykazano także, że pewne adhezyny: adhezyna wiążąca kwas sjalowy - SabA *(sialic acid binding adhesin),* adhezyna wiążąca antygeny grupowe krwi - BabA *(blood group antigen binding adhesin),* związane z adhezją lipoproteiny A i B - AlpA/B *(adherence-associated lipoprotein A/B),* zewnętrzne białko zapalne A - OipA *(outer inflammatory protein A)* i białko Q błony zewnętrznej *Helicobacter* - HopQ *(Helicobacter outer membrane protein Q)* pośredniczą w kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka przez te bakterie i inicjują stan zapalny *(Matsuo i wsp. 2017).*

- **BabA (HopS)**

BabA jest białkiem o masie 78 kDa kodowanym przez gen *babA*. Bierze udział w wiązaniu na komórkach gospodarza dwóch fukozylowanych antygenów: H typu 1 i Le^b *(Ilwer i wsp. 1998).* Uczestniczy w adhezji *H. pylori* do komórek nabłonkowych za pośrednictwem mucyn – MUC (*mucin):* 5AC, a także MUC1 i MUC2, które zawierają receptory dla BabA *(van den Brink i wsp. 2000,; Linden i wsp. 2009; Kenny i wsp. 2012; Magalhães i wsp. 2016).* Rozpoznanie antygenu Le^b przez BabA wydaje się kluczowe w kolonizacji komórek nabłonkowych przez *H. pylori*, ale w ten proces są prawdopodobnie zaangażowane również dodatkowe epitopy i/lub adhezyny. U osób nie posiadających MUC5AC i Le^b-ujemnych wiązanie BabA z komórkami nabłonkowymi jest zahamowane *(van de Bovenkamp i wsp. 2003).* Sugeruje się, że BabA nasila translokację CagA do komórek żołądka i sprzyja rozwojowi zapalenia żołądka o ciężkim przebiegu *(Ishijima i wsp. 2011).*

- **OipA (HopH)**

Białko OipA o masie 34 kDa należy do rodziny białek Hop *(Yamaoka i wsp. 2000).* Uczestniczy w kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka gospodarza przez *H. pylori*, natomiast pierwotnie zostało zidentyfikowane jako białko wywołujące odpowiedź zapalną *(Yamaoka i wsp. 2000).* Gen kodujący białko OipA występuje u wszystkich szczepów *H. pylori,* ale jego ekspresja ma charakter zmienności fazowej ze względu na zmienną liczbę powtórzeń dinukleotydowych CT w regionie 5 '*oipA (Yamaoka i wsp. 2000).* Wytwarzanie OipA jest silnie związane z nasiloną produkcją interleukiny-IL *(interlrukin)*-8 *(Yamaoka i wsp. 2000).*

- **SabA (HopP)**

SabA jest białkiem *H. pylori* o masie 70 kDa, które pełni funkcję ligandu dla sialowanych cząsteczek - $Lewis^X$ lub $Lewis^A$ (sLe^x and sLe^a) w nabłonku żołądka *(Aspholm i wsp. 2006).* Zapalenie błony śluzowej żołądka związane z zakażeniem *H. pylori* jest następstwem zastąpienia niesjalowanych antygenów Le^X i Le^A przez sialowane *(Mahdavi i wsp. 2002)*. W proces adhezji *H. pylori* za pośrednictwem SabA jest zaangażowany T4SS oraz czynnik martwiczy nowotworu -TNF *(tumor necrosis factor),* które indukują ekspozycję sLe^x w nabłonku żołądka *(Marcos i wsp.*

2002). W badaniach *in vitro* wykazano, że po związaniu węglowodanów występujących na powierzchni granulocytów, przez SabA, dochodzi do nieopsonicznej aktywacji tych komórek *(Unemo i wsp. 2005).* SabA prawdopodobnie wiąże również białka zewnątrzkomórkowej macierzy m.im. lamininy, co może sprzyjać ścisłemu przyleganiu pałeczek do komórek gospodarza *(Walz i wsp. 2005).*

- **Ureaza**

Ureaza (EC 3.5.1.5) jest hydrolazą, rozkładającą mocznik do amoniaku i karbaminianu, który następnie rozpada się do drugiej cząsteczki amoniaku i kwasu węglowego *(Follmer 2010).* Ureaza *H. pylori* jest kodowana przez dwa geny strukturalne: *ureA* kodujący podjednostkę β (UreA) i *ureB* kodujący podjednostkę α (UreB). W klasterze *ure* występują też dodatkowe geny: *ureD, ureE, ureF, ureG,* których produkty są niezbędne do syntezy aktywnej ureazy. Na każdą podjednostkę α przypada miejsce aktywne z dwoma atomami niklu *(Mobley i wsp. 1995).* Polipeptydy UreD, UreF, UreG są zależnymi od GTP białkami opiekuńczymi, które wiążą apoproteinę ureazy i są zaangażowane w transport jonów niklu *(Park i wsp. 1996; Olivera-Severo i wsp. 2006)*. Białko UreE dostarcza jony niklu do centrum aktywnego apoenzymu, przekształcając go w formę aktywną *(Farnham i Dube 2015; Palizban i Saghaie 2016).*

Ureaza umożliwia trwałą kolonizację organizmu gospodarza przez *H. pylori* przy niskim pH żołądka *(Farnham i Dube 2015; Palizban i Saghaie 2016).* Żywe pałeczki *H. pylori* adsorbują na powierzchni enzym uwalniany podczas autolizy *H. pylori*, co dodatkowo wspomaga przedostawanie się bakterii przez warstwy śluzu i kolonizację nabłonka żołądka *(Olivera-Severo i wsp. 2006; Schoep i wsp. 2010; Lee i wsp. 2015).* Podczas zakażenia *H. pylori* ureaza działa chemotaktycznie na: monocyty, neutrofile oraz limfocyty, w tym limfocyty pomocnicze Th17 co prowadzi do sekrecji prozapalnych cytokin (IL-6, IL-23). Nadmierna aktywacja granulocytów skutkuje ich de granulacją i w efekcie uszkodzeniem komórek nabłonka *(Ihan i Gubina 2014; Lee i wsp. 2015).* Niekorzystna reakcja zapalna może być również inicjowana na skutek adsorpcji enzymu uwalnianego przez bakterie w warstwie śluzu *(Dunn i Phadnis 1998).* Ureaza w komórkach nabłonkowych żołądka, śródbłonka naczyń

krwionośnych i makrofagach, stymuluje ekspresję indukowanej syntazy tlenku azotu - iNOS *(inducible nitric oxide synthase).* Wywołuje działanie cytotoksyczne *(Olivera-Severo i wsp. 2006*) bezpośrednio, przez amoniak NH_3- będący produktem hydrolizy mocznika lub pośrednio. Podczas zakażenia *H. pylori* dochodzi do wybuchu tlenowego w neutrofilach i uwolnienia nadtlenku wodoru, który następnie utlenia jony chloru do podchloranów (OCl^-). Amoniak powstały z rozkładu mocznika reaguje z nimi przechodząc w formę toksyczną dla komórek *(Mobley i Island 1995*). Ponadto aktywność ureolityczna ureazy wpływa na osłabienie pochłaniania bakterii przez komórki żerne, w wyniku zahamowania wiązania dopełniacza oraz nasila fosforylację lekkiego łańcucha regulacyjnego miozyny. Ureaza zaburza działanie nabłonkowych kompleksów szczelinowych, które odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu funkcji barierowej nabłonka, polaryzacji komórek, jak również adhezji międzykomórkowej *(Schen i wsp. 2006*). Ponadto ureaza aktywuje płytki krwi za pośrednictwem ścieżki zależnej od lipooksygenazy, co może tłumaczyć rolę zakażenia *H. pylori* nie tylko w chorobach przewodu pokarmowego, ale także w chorobach sercowo-naczyniowych *(Wasserman i wsp. 2010).*

- **Lipopolisacharyd (LPS)**

LPS to endotoksyna charakterystyczna dla błony zewnętrznej Gram-ujemnych bakterii, która silnie oddziałuje z komórkami układu odpornościowego, skutkując produkcją cytokin (TNF, IL-1, IL-6), reaktywnych form tlenu - ROS *(reactive oxygen species)* i reaktywnych form azotu. LPS jest heteropolimerem zbudowanym z części lipidowej i polisacharydowej *(Raetz i Whitfield 2002).* Hydrofobową część lipidową stanowi lipid A, który utrzymuje LPS w ścianie komórki bakteryjnej i jest jego najbardziej konserwatywną częścią warunkującą właściwości toksyczne *(Seydel i wsp. 2000).* Lipid A łączy się z częścią wielocukrową poprzez reszty kwasu Kdo (2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego). W jej skład wchodzą syntezowane oddzielnie i różniące się budową chemiczną dwa fragmenty cukrowe: rdzenia i łańcucha O-swoistego. Bezpośrednio z lipidem A wiąże się oligosacharyd rdzeniowy, który połączony jest z częścią O-swoistą LPS (antygen O-swoisty). Oligosacharydy O-swoiste poszczególnych rodzajów bakterii wykazują ogromną różnorodność strukturalną, różniąc się zarówno typem występujących monosacharydów jak i długością łańcuchów. Region O-swoisty wykazujący bardzo dużą zmienność

determinuje swoistość antygenową bakterii *(Seydel i wsp. 2000; Raetz i Whitfield 2002; Fowler i wsp. 2003; Moran 2008)*

LPS *H. pylori* różni się od LPS typowych Gram-ujemnych bakterii, w obszarze lipidu A, który posiada mniej, ale za to dłuższych łańcuchów kwasów tłuszczowych *(Muotiala i wsp. 1992; Matsuyama i wsp. 2001).* Większość szczepów *H. pylori* produkuje LPS, zawierający fukozylowane antygeny oligosacharydowe, które są identyczne z ludzkimi antygenami: Le^a, Le^b, sLe^x, sLe^y, H oraz antygenami A, B układu grupowego krwi AB0. Antygeny Le *H. pylori* wykazują znaczną zmienność, co sprzyja unikaniu przez te bakterie odpowiedzi odpornościowej gospodarza *(Simoons-Smit i wsp. 1996; Appelmelk i wsp.1999, 2000; Monteiro i wsp. 1998; Heneghan i wsp. 2000; 2000; Amadei i wsp. 2003).* Podobieństwo LPS *H. pylori* do antygenów grupowych krwi gospodarza odgrywa istotną rolę w adhezji tych bakterii i kolonizacji błony śluzowej żołądka *(Moran i wsp. 1998; Wirtt i wsp. 1999; Chmiela i wsp. 1998, 1999, 2014)*. Skutkiem mimikry molekularnej może być indukcja autoprzeciwciał, np. wobec pompy protonowej komórek okładzinowych żołądka zawierającej antygeny Le *(Ge Z. i wsp. 1995, Melchers i wsp. 1996).* Nie jest jasne, czy zdolność do naśladowania szerokiego zakresu antygenów grupowych krwi gospodarza poprzez zmianę fazy determinantów antygenowych Le w LPS stymuluje procesy autoimmunologiczne, czy też bardziej osłabia działanie układu odpornościowego. Ekspresja u *H. pylori* antygenów Le podobnych do autoepitopów prawdopodobnie tym drobnoustrojom umożliwia ucieczkę przed mechanizmami efektorowymi układu odpornościowego gospodarza

LPS *H. pylori* stymuluje wytwarzanie jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B - NF-κ B (*nuclear factor κB)* i IL-8, zarówno w komórkach nabłonka żołądka jak i komórkach odpornościowych w sposób niezależny od CagA *(Maeda i wsp. 2001; Bhattacharyya i wsp 2002).* Jedmakże w porównaniu z innymi bakteriami Gram-ujemnymi, LPS *H. pylori* jest słabym aktywatorem komórek wrodzonej odpowiedzi odpornościowej *(Rudnicka i wsp. 2003; Ihan i Gubina 2014),* ponieważ posiada większe powinowactwo do receptorów TLR-2, niż TLR-4 co skutkuje osłabieniem przekazywania sygnałów przez receptor TLR-4. *(Appelmelk 1997; Monterio i wsp. 1998; Amadei i wsp. 2003; Rudnicka i wsp. 2003; Esmaeilli i wsp. 2013).* Spośród cytokin stymulowanych LPS *H. pylori* IL-1β oraz TNF-α hamują aktywność komórek

okładzinowych odpowiedzialnych za transport jonów H+ i Cl– do światła żołądka, co skutkuje podwyższeniem pH sprzyjając kolonizacji błony śluzowej żołądka przez *H. pylori (Smith i wsp. 2003).*

Wykazano ponadto, że LPS *H. pylori* hamuje uwalnianie tlenku azotu - NO (*nitric oxide)* przez makrofagi *(Handa i wsp. 2011; Ihan i Gubina 2014)*, w wyniku zwiększonej produkcji poliamin, co jest następstwem indukcji arginazy i dekarboksylazy ornityny. Wzrost produkcji argininy, sprzyja powstawaniu mocznika, który jest substratem dla ureazy *H. pylori (Allen 2007; Handa i wsp. 2011).* LPS stymuluje neutrofile do produkcji $O_2^{\cdot-}$, nasila również aktywność receptorów Toll-podobnych w komórkach nabłonka żołądka, wskutek czego dochodzi do zwiększonej produkcji $O_2^{\cdot-}$ *(Handa i wsp. 2011).*

Podsumowywując, zróżnicowanie strukturalne, słaba fosforylacja i acylacja lipidu A LPS *H. pylori* oraz zjawisko mimikry antygenowej przyczyniają się do rozwoju w następstwie zakażenia przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka lub dwunastnicy wrzodów tych narządów a nawet raka.

- **Wyspa patogenności CagA i białko CagA**

Białko CagA o masie cząsteczkowej w zakresie 120-145 kDa jest onkoproteiną o właściwościach immunomodulujących *(Nesic i wsp. 2014).* Wykazano, że szczepy *H. pylori* CagA+ powodują u osób zakażonych cięższy przebieg choroby i zwiększają ryzyko wystąpienia raka żołądka, niż u osób zakażonych szczepami CagA-. Związane jest to z motywem EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), białka CagA, który może występować w różnej formie: EPIYA- A, B, C lub D. Z większą liczbą motywów EPIYA-C lub obecnością EPIYA-D wiąże się nasilanie interakcji białka CagA z fosfatazą tyrozynową - SHP-2 *(Src homology region 2 domain-containing phosphatase)*, co zwiększa ryzyko wystąpienia metaplazji jelitowej i raka żołądka *(Beltrán-Anaya i wsp. 2014).* Szczepy *H. pylori* pozbawione białka CagA mogą inicjować stan zapalny za pośrednictwem innych mechanizmów zależnych od wyspy chorobotwórczości *cag*PAI *(pathogenicity island).* Obszar ten o wielkości 40 kpz zawiera około 40 genów. W obrębie *Cag*PAI kodowany jest T4SS, który wiąże się z integryną α5β1 na komórkach gospodarza *(Hatakeyama 2014).* System ten umożliwia wprowadzanie białka CagA i produktów rozpadu peptydoglikanu *H. pylori* bezpośrednio z cytozolu komórki bakteryjnej do

komórki gospodarza *(Tanaka i wsp. 2010; Kuklińska i wsp. 2011; Hatakeyama 2014)*. Komponenty te aktywują NF-κB, wyzwalając wydzielanie przez komórki nabłonkowe żołądka prozapalnych cytokin i chemokin, w szczególności IL-8 *(Tanaka i wsp. 2010).* Po przedostaniu się do komórki gospodarza, białko CagA może ulegać szybkiej fosforylacji w swoich motywach EPIYA przez kinazy tyrozynowe - Src *(Scr family kinase),* a następnie wchodzić w interakcję z fosfatazą komórkową SHP-2. Efektem tej interakcji jest zmiana w układzie szkieletowym komórki poprzez przegrupowanie aktyny. Kinazy odpowiadające za fosforylację CagA są znane jako białka onkogenne kontrolujące przemiany cytoszkieletu, proliferację i różnicowanie komórek. Fosforylowane białko CagA przyczynia się do zmiany ich kształtu na wrzecionowaty – „fenotyp kolibra" *(Kuklińska i wsp. 2011; Ihan i Gubina 2014).* Białko CagA może występować w komórkach gospodarza także w formie niefosforyzowanej oddziaływać z wieloma ich komponentami, w tym z białkiem połączeń ścisłych - ZO-1 (*zona occludens protein-1*). Efektem tej interakcji jest rozszczelnienie ścisłych połączeń międzykomórkowych. Z kolei interakcja CagA z E-kadheryną zaburza funkcję kompleksów E-kadheryna/β-katenina, które odpowiadają za regulację ekspresji genów o potencjale onkogenów *(Murata-Kamiya i wsp. 2007; Kurashima i wsp. 2008.)* Białko CagA poprzez aktywację NF-κB osłabia ekspresję ludzkiej defensyny typu β - HBD1 *(human β-defensin),* co sprzyja trwałej konizacji nabłonka żołądka przez *H. pylori (Murata-Kamiya i wsp. 2007; Kurashima i wsp. 2008.)* Białko CagA, podobnie jak inne czynniki wirulencji *H. pylori,* oddziałuje na układ odpornościowy gospodarza m.in. poprzez blokowanie dojrzewania komórek dendrytycznych-DC (*dendritic cell*) produkcję TNFα, IL-12 oraz innych cytokin prozapalnych, a jednocześnie poprzez hamowanie wytwarzania przeciwzapalnej IL-10 *(Wu i wsp. 2014)*. Szczególnie białko CagA w formie ufosforylowanej może sprzyjać wyciszeniu odpowiedzi odpornościowej gospodarza, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju przewlekłej odpowiedzi zapalniej, uszkodzenia komórek nabłonka żołądka, a także zmian nowotworowych *(Tanaka i wsp. 2010).*

- **Toksyna wakuolizującą VacA**

Szacuje się, że około 50% wszystkich szczepów *H. pylori* wydziela toksynę VacA, która jest wysoce immunogennym białkiem o masie 95 kDa, zbudowanym z dwóch

podjednostek: p33 (białko rdzenia) i p55 (białko otaczające rdzeń) *(Cover i Blaser 1992).* Toksyna VacA odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby wrzodowej żołądka i nowotworów tego narządu *(Marchetti i wsp. 1995; Ogura i wsp 2000).* Tworzy kanały błonowe, zakłócając funkcję endosomów i lizosomów, a także przekaźnictwo sygnałów komórkowych i funkcje cytoszkieletu. Ponadto indukuje apoptozę komórek i moduluje procesy odpornościowe *(Cover i Blanke 2005).* Jest wytwarzana jako protoksyna o masie 140 kDa, która podczas wydzielania przekształca się w cząsteczkę o masie 95 kDa.

Wszystkie szczepy *H. pylori* posiadają funkcjonalny gen *vacA,* jednak aktywność białka jest cechą szczepową *(Cover i Blaser 1992; Cover 1996; Jonge i wsp. 2004).* Wynika to z heterogenności sekwencji w genie *vacA* w regionie sygnałowym (s) oraz w regionie środkowym (m). Region s, kodujący peptyd sygnałowy, występuje w dwóch formach: s1 lub s2, podczas gdy region m, który koduje białko p58 zawierające domenę wiążącą komórki występujące w formie m1 lub m2 *(Atherton i wsp. 1995; van Doorn i wsp. 1998).* Aktywność wakuolizacyjna toksyny VacA jest wysoka u szczepów o genotypie s1/m1, średnia u szczepów o genotypie s1/m2 i nie występuje w wariancie genotypu s2/m2 *(Atherton i wsp. 1995).* Szczepy *H. pylori* o wariancie s1/m1 są częściej przyczyną choroby wrzodowej żołądka lub nowotworów żołądka niż szczepy o wariancie s2/m2 *(Atherton i wsp. 1995).* Jedakże, nawet u tego samego pacjenta nasilenie wytwarzania *VacA* może różnić się w czasie trwania zakażenia z powodu szybkiego wzrostu bakterii, które podlegają procesom zmienności *(Armstrong i wsp 1987; Falush i wsp. 2001).* Ta mikroewolucja powoduje czasowe zmiany toksyczności VacA, co może mieć wpływ na nasilanie powstawania owrzodzeń lub osłabienie tego procesu *(Armstrong i wsp 1987).*

Toksyna VacA wiąże się z receptorami w błonach endosomalnych i mitochondrialnych komórek nabłonkowych żołądka tworząc w nich pory, co skutkuje wydzielaniem do środowiska mocznika i anionów. Za formowanie kanałów jonowych odpowiada jednostka p33 toksyny VacA, która zwiększa również przepuszczalność międzykomórkową, prowadząc do uwolnienia z komórek gospodarza składników odżywczych i kationów *(Montecucco i de Bernard 2003).* Znaczna część wydzielanej toksyny nie jest uwalniana do środowiska, ale pozostaje związana z błoną zewnętrzną *H. pylori*. W takiej formie wywiera działanie

cytotoksyczne *(Ilver i wsp. 2004; Fitchen i wsp. 2005; Rassow i Meinecke 2012).* Powinowactwo toksyny VacA do sfingomieliny znajdującej się w tzw. „tratwach lipidowych" błon komórkomych ułatwia jej wyniknięcie do komórek. W wychwytywaniu toksyny przez komórki nabłonka biorą udział dwa białka błony plazmatycznej – RPTP *(receptor protein-tyrosine phosphatase)* α i RPTP β. Po wniknięciu do komórki toksyna akumuluje się we wczesnych endosomach, tworząc pęcherzyki transportowe-wakuole, które przyciągają kompleksy F-aktyny. Gromadzą się one i przemieszczają w całej komórce. VacA wnika do endosomów, na powierzchni których występują GTPazy guanozyno-5′-trifosforanu *(Guanosine-5′-triphosphate -GTPase)* i białko Rab7 powiązane z Ras- *(Ras-related protein 7).* Rozrost wakuol pod wpływem VacA powoduje, że cytozol komórek gospodarza przybiera formę piankowatą. Wzrost stężenia jonów chlorkowych, wewnątrz endosomów pod wpływem VacA, powoduje aktywację błonowej ATP-azy typu V. Wraz ze wzrostem zakwaszenia środowiska wewnątrz endosomów wzrosta ilość jonów zasadowych, zwłaszcza amonowych, które gromadzą się wewnątrz endosmów, co doprowadza do pęcznienia komórki wskutek osmozy. Znaczna ilość toksyny VacA akumuluje się w mitochondriach, co powoduje całkowitą utratę w nich potencjału błonowego wskutek otwarcia już istniejących kanałów jonowych oraz powstawania nowych. Te procesy prowadzą do inaktywacji łańcucha oddechowego w komórkach, utraty ich kształtu i rozpadu mitochondriów *(Rassow i Meinecke 2012)*. W wyniku uszkodzenia mitochondriów do cytoplazmy zostaje uwolniony cytochrom c, co skutkuje indukcją apoptozy *(Teloferd i wsp. 1994; Lupetti i wsp. 1996; Molinari i wsp. 1998; Tombola 1999; Ji i wsp. 2000; Kuck i wsp. 2001; Cover i wsp. 200; Montecucco i de Bernard 2003; Kim i wsp.2004; Fitchen i wsp. 2005; Kuklińska i wsp. 2011).* Proapoptotyczne działanie VacA prawdopodobnie zależy od typu komórek i być może jest ograniczone do komórek nabłonka żołądka, takich jak komórki okładzinowe *(Neu i wsp. 2002; Gebert i wsp. 2003).* Może to skutkować zmniejszeniem wydzielania kwasu żołądkowego, tym samym stanowić predyspozycje do rozwoju raka żołądka *(Neu i wsp. 2002).*

Toksyna VacA przenika także do głębszych tkanek żołądka, gdzie może oddziaływać z komórkami odpornościowymi, takimi jak granulocyty, monocyty, limfocyty B i limfocyty T. Interakcja VacA z komórkami prezentującymi antygen – APC *(antygen presenting cells),* skutkuje zahamowaniem prezentacji antygenów oraz

proliferacji limfocytów T *(Betten i wsp. 2001; Molinari i wsp. 1998).* W przeciwieństwie do CagA, VacA nie indukuje apoptozy limfocytów T *(Delaney i wsp. 2005; Wang i wsp. 2000)*, ale proliferacja limfocytów T jest znacznie osłabiona przez VacA. To sugeruje znaczenie tej toksyny w utrwalaniu zakażenia *H. pylori*, poprzez zahamowanie ekspansji limfocytów. Wykazano silną korelację pomiędzy aktywnością toksyny VacA a wirulencją *H. pylori,* przy czym szczepy typu s1/m1 okazały się najbardziej zjadliwe w populacjach zachodnich *(Atherton i wsp. 1997; Gunn i wsp. 1998; Wang i wsp. 1998; Keates i wsp. 1999; Delaney i wsp. 2005; Sundrud i wsp. 2004; Boncristiano i wsp. 2003).* Wykazano także zależnośc pomiędzy wariantem s1/m1 *H. pylori* oraz zdolnością do wytwarzania CagA. Jednak jak dotąd żadnego markera wirulencji nie uznao za niezależny czynnik determinujący rozwój procesu chorobowego wskutek zakażenia *H. pylori (Yamazaki i wsp. 2003).*

- **Białko *H. pylori* aktywujące neutrofile (HP-NAP)**

HP-NAP *(Helicobacter pylori-neutrophil activating protein)* jest wysoce konserwatywnym białkiem o masie 150 kDa, składającym się z 12 identycznych monomerów *(Evans i wsp. 1995; Bernard i D'Elios 2010).* Białko to jest zlokalizowane głównie w bakteryjnym cytosolu i może być uwalniane po lizie komórki. HP-NAP ma budowę sferyczną, a w jego centralnej części znajduje się miejsce wiązania jonów żelaza. Warunkuje wiązanie tych bakterii z glikoproteinami występującymi w mucynie, ułatwiając tym samym kolonizację komórek nabłonkowych gospodarza *(Namavar i wsp. 1998; Tonello i wsp. 1999; Zanotti i wsp. 2002).* HP-NAP należy do białek rodziny Dps *(DNA - protecting protein)* chroniących DNA, przed działaniem ROS. Jako podobne do rodziny białek ferrytyny wiąże żelazo *(Tonello i wsp. 2002; Kottakis i wsp. 2007; Fu 2014).* Z drugiej strony stymuluje wytwarzanie przez neutrofile ROS i mieloperoksydazy (MPO), co jest szczególnie istotne ponieważ, przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka podczas zakażenia *H. pylori* charakteryzuje się naciekiem neutrofilów i komórek jednojądrzastych do błony śluzowej żołądka (Evans i wsp. 1995; *Wang i wsp. 2008; Bernard i D'Elios 2010).* HP-NAP nasila również ekspresję integryny β2 (CD18) na neutrofilach i na monocytach *(Brisslert i wsp. 2005; Cappon i wsp. 2010).* Nasila syntezę i uwalnianie IL-8, białka zapalnego makrofagów 1 alfa – MIP 1α *(macrophage inflammatory protein-1 alpha)* i MIP-1β, wytwarzanie czynnika tkankowego *(TF, tissue factor)* oraz inhibitora

aktywatora plazminogenu-2 *(PAI-2, plasminogen activator inhibitor)* przez komórki jednojądrzaste krwi ludzkiej-MBC *(blood mononuclear cell).* Ponadto wzmaga sekrecję TNF-α, IL-6 i IL-8 przez monocyty oraz uwalnianie β heksozoaminidazy i IL-6 przez komórki tuczne *(Montemurro i wsp. 2001; 2002; Amadei i wsp. 2006; Polenghi i wsp. 2007; Del Prete i wsp. 2008).* Wpływając na wytwarzanie TF i PAI-2 przyczynia się do rozwoju zapalenia błony śluzowej żołądka i uszkodzenia tkanek podczas zakażenia *H. pylori,* ponieważ gojenie tkanek może być zahamowane z powodu aktywności prokoagulacyjnej i antyfibrynolitycznej TF i PAI *(Montemurro i wsp. 2001).* Wykazano, że TNF-α i interferon gamma - IFN-γ *(interferon gamma)* nasilają wytwarzanie ROS przez neutrofile, co jest zależne od HP-NAP. Cytokiny w tym chemokiny indukowane przez HP-NAP stanowią sygnały prozapalne. Pośrednio przyczyniają się do uszkodzenia błony śluzowej żołądka, co sprzyja wzrostowi *H. pylori* na skutek uwalniania z tkanek czynników odżywczych.

Mechanizmy molekularne, dzięki którym HP-NAP stymuluje wytwarzanie ROS przez neutrofile, są związane z aktywacją w błonie komórkowej oksydazy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH). Szlak sygnałowy obejmuje wrażliwe na toksynę białko G, 3-kinazę fosfatydyloinozytolu - PI3-K *(phosphoinositide 3-kinase),* kinazę tyrozynową z rodziny Src i cytosolowe jony wapnia *(Satini i wsp. 2000).* Kinaza regulowana pozakomórkowo w szlaku kinazy ERK *(extracellular signal-regulated kinase)* oraz kinaza białkowa aktywowana mitogenem p38 - p38 - MAPK *(mitogen-activated protein),* pełnią ważną rolę w adhezji i chemotaksji neutrofilów oraz inicjacji w nich wybuchu tlenowego, w odpowiedzi na HP-NAP *(Del Prete i wsp. 2008).* HP-NAP stymuluje także neutrofile i monocyty do wytwarzania IL-12, co wpływa na zwiększenie polaryzacji limfocytów w kierunku odpowiedzi typu Th1 *(Amadei i wsp. 2006).* Ponadto białko to stymuluje wydzielanie IL-23 przez monocyty i ich różnicowanie do komórek dendrytycznych, a w makrofagach nasila ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II - MHC II *(major histocompatibility complex)* i przez to ich zdolność prezentacji antygenów *(Amadei i wsp. 2006; D'Elios i wsp. 2000).*

Zaburzenia bariery nabłonkowej żołądka w zakażeniu H. pylori

- ***Struktura i funkcje błony śluzowej żołądka***

Do głównych funkcji żołądka człowieka należy: rozdrabnianie pokarmu, trawienie białek, cukrów oraz wstępne trawienie tłuszczy. Narząd ten jest zbudowany z trzech warstw błony śluzowej, mięśniowej i surowiczej. Błona śluzowa wyścielająca żołądek zbudowana jest z warstwy: nabłonkowej i tzw. blaszki właściwej, w której znajdują się naczynia krwionośne i limfatyczne, gruczoły, nerwy oraz mięśnie gładkie *(Brandtzaeg i wsp. 2008; Keith i wsp. 2015).* Gruczoły składają się z kilku rodzajów komórek: komórek okładzinowych, które wydzielają kwas solny oraz czynnik Castela wiążący witaminę B12, komórek produkujących pepsynogen, komórek macierzystych, z których powstają komórki nabłonkowe śluzówki, komórek dokrewnych wydzielających serotoninę oraz komórek G produkujących gastrynę. Błona mięśniowa żołądka, tworzy ściany żołądka, które są silnie unaczynione. Jest umiejscowiona pomiędzy błoną śluzową wewnętrzną a błoną zewnętrzną (przydanka). Kurczy się pod wpływem bodźców pochodzących z układu współczulnego. Zbudowana jest z trzech warstw mięśni: warstwy podłużnej, budującej krzywiznę mniejszą i większą żołądka, warstwy okrężnej występującej w części odźwiernikowej żołądka oraz warstwy skośnej znajdującej się w rejonie dna żołądka. Z kolei błona surowicza składa się z cienkiej warstwy nabłonka jednowarstwowego płaskiego, który wydziela płyn surowiczy, zmniejszający tarcie, umożliwiając ruch narządu względem otaczających tkanek *(Keith i wsp. 20015).*

Błona śluzowa żołądka jest eksponowana na działanie czynników endogennych takich jak: kwas solny, pepsyna, kwasy żółciowe, a także egzogennych komponentów pokarmowych i leków, w tym m.in., etanolu, niesteroidowych leków przeciwzapalnych, a także toksyn bakteryjnych *(Tarnawski i wsp. 1999).* Pomimo narażenia na te czynniki, w prawidłowych warunkach, błona śluzowa utrzymuje integlaność strukturalną dzięki mechanizmom obronnym, na które składają się komponenty przednabłonkowe, nabłonkowe i podnabłonkowe *(Laine i wsp. 2008).* Do przednabłonkowych komponentów należy fosfolipid fosforanu śluzu, który stanowi pierwszą linię ochronną błony śluzowej żołądka. Nabłonkowe komponenty wytwarzają i wydzielają węglowodany, śluz, fosfolipidy, peptydy, prostaglandyny

oraz białka Hsp *(Tarnawski i wsp. 2012).* Integralność warstwy komórek nabłonkowych żołądka jest utrzymywana poprzez stałe odnawianie komórek w wyniku regulacji proliferacji komórek progenitorowych przez czynniki wzrostu, estradiol i surwiwinę oraz białko promujące mitozę *(Tarnawski i wsp. 2012).* Warstwa podnabłonkowa błony śluzowej żołądka jest silnie unaczyniona, a jej funkcja jest regulowana przez substancje wydzielane do krwi m.in. hormony, czynniki wzrostu i cytokiny *(Tarnawski i wsp. 2012).* Przepływ krwi przez naczynia włosowate ma kluczowe znaczenie dla utrzymania struktury i funkcji wszystkich tkanek, w tym śluzówki żołądkowo-jelitowej *(de Foneska i Kaunitz 2010).* Sąsiadujące ze sobą komórki śródbłonka są wzajemnie ze sobą połączone tworząc zwartą barierę, która umożliwia dyfuzję substancji rozpuszczalnych, tlenu, CO_2 i składników odżywczych. Śródbłonek stanowi metabolicznie aktywny narząd zaangażowany w koagulację i wytwarzanie m.in. prostanoidów, hormonów i czynników wzrostu *(Yuan i sp. 2005; Lucas i wsp. 2009).* Charakterystyczną cechą komórek śródbłonka żołądka jest występowanie licznych pęcherzyków pinocytoarnych, które biorą udział w transporcie substancji przez barierę nabłonkową *(Yuan i sp. 2005; Lucas i wsp. 2009).* Unikatowe pęcherzyki, tzw. ciałka Weibel-Palade, obecne w śródbłonku, magazynują m.in. czynnik von Willebranda, który odgrywa ważną rolę w koagulacji krwi a także P-selektynę, która ułatwia migrację leukocytów do miejsca urazu lub infekcji *(Wagner i wsp. 1982; Bonfanti i wsp. 1989).* W pęcherzykach Weibel-Palade znajdują się także chemokiny, IL-8, eotaksyna-3, endotelina-1 oraz angiopoetyna-2 *(Wagner i wsp. 1982; Bonfanti i wsp. 1989).*

Niestymulowany śródbłonek naczyniowy jest nieprzepuszczalny dla substancji dyfundujących z krwi i działa jako selektywna bariera pomiędzy światłem naczynia a otoczeniem tkanki, regulująca wymianę tkankową płynów, białych krwinek, składników odżywczych, metabolitów i zapobiegająca także przedostawaniu się patogenów. W odpowiedzi na lokalne bodźce, np. uszkodzenie, komórki śródbłonka odpowiadają wydzielaniem endoteliny i leukotrienu C4 (silne substancje zwężające naczynia), które wpływają na napięcie mięśni gładkich naczyń a także tleneku azotu- NO *(nitric oxide)* i prostacykliny - PGI2 *(prostacyclin) (Yuan i wsp. 2005; Lucas i wsp. 2009)* o działaniu ochronnym. Funkcję ochronną komórek śródbłonka warunkują także tlenek węgla - CO *(carbon oxide),* czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego -

VEGF *(vascular endothelial growth factor)* oraz czynnika wzrostu fibroblastów - bFGF *(fibroblast growth factor) (Ferrara 2004; Kliche i wsp. 2011).* Te mediatory pochodzenia śródbłonkowego umożliwiają szybkie dostosowywanie się śródbłonka do zmian w lokalnym środowisku. Zmniejszająa aktywację płytek krwi i leukocytów, zapobiegają powstawaniu skrzepów, promują trombolizę, utrzymując perfuzję tkanek i chroniąc tkankę tłuszczową przed ostrym uszkodzeniem.

Mechanizmy destabilizacji przez *H. pylori* bariery nabłonkowej żołądka

- **Oddziaływania *H. pylori* z warstwą śluzu żołądka**

Warstwa śluzu o grubości około 300 μm która pokryw komórki nabłonka żołądka, to fizyczna bariera, zapobiegająca interakcji tych komórek z patogenam, a przez to kolonizacji. Zewnętrzna warstwa luźno przylega do komórek od strony światła żołądka i stale jest usuwana i odnawiana *(Linden i wsp. 2008).* Główną funkcją śluzu pokrywającego żołądek jest ochrona przed szkodliwymi czynnikami chemicznymi, zakaźnymi, enzymami i uszkodzeniami mechanicznymi. Działania te są przypisywane głównie mucynom *(Heneghan i wsp. 2000).* Są to glikoproteiny o masie 250–2000 połączone z seryną i treoniną rdzenia białkowego kDa, których cechą charakterystyczną jest występowanie antygenów Le w łańcuchach oligosacharydowych *(Cooke i wsp. 2009; Moran i wsp. 2011).* Mucyny obecne w żołądku dzielą się na dwie grupy: wydzielnicze MUC5AC (wydzielana przez komórki nabłonkowe żołądka) i MUC6 (wydzielana przez komórki gruczołów żołądka) oraz związane z błoną komórkową - MUC1. Drobnoustroje wnikające do organizmu gospodarza drogą pokarmową, takie jak *H. pylori,* muszą pokonać tę barierę aby i dotrzeć do komórek nabłonka. *H. pylori* kolonizuje komórki nabłonkowe żołądka organizmu gospodarza, za pośrednictwem licznych adhezyn w tym białek OMP. Pierwszym etapem kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka przez *H. pylori* jest pokonanie grubej warstwy śluzu *(Schreiber i wsp. 2005).* Bakterie te mogą zmienić strukturę śluzu poprzez tioredoksynę, która redukuje wiązania dwusiarczkowe mucyn, co powoduje zmniejszenie zdolności tworzenia żelu przez mucyny co ułatwia przemieszczanie się bakterii przez śluz *(Windle i wsp. 2000).* W wyniku hydrolitycznego rozkładu mocznika przez ureazę *H. pylori* powstaje

amoniak, który podwyższa pH, co w miejscu bytowania bakterii umożliwia modyfikację śluzu poprzez zmniejszanie jego lepkości i sprężystości *(Celli i wsp. 2007, 2009).* Pałeczki *H. pylori* zakłócają również wytwarzanie i dystrybucję przeciwciał wydzielniczych IgA (sIgA), które są wydzielane przez komórki plazmatyczne i transportowanie do warstwy śluzu *(Birkholz i wsp. 1998).* Pokonanie przez *H. pylori* wyżej wymienionych mechanizmów ochronnych na poziomie błony śluzowej układu pokarmowego skutkuje kolonizacją komórek nabłonkowych żołądka gospodarza przez te bakterie. Mucyny żołądkowe sprzyjają proliferacji *H. pylori,* a ich struktury cukrowe wiążą się z ahhezynami tych bakterii. Może to tłumaczyć silne powinowactwo *H. pylori* do tej mucyny *(van den Brink i wsp. 2000).* Wykazano, że *H. pylori* oddziałuje z antygenem grupowym krwi Le^b znajdującym się w strukturze MUC5AC, za pośrednictwem białka powierzchniowego BabA *(Ilver i wsp. 1998). H. pylori* może również wchodzić w interakcje z sialowanymi komponentami mucyn – sjalo-LeX i za pośrednictwem adhezyny SabA. Wykazano, że pałeczki *H. pylori* poza mucynami oddziałują także z glikolipidami występującymi w śluzie oraz białkami zewnątrzkomórkowej macierzy ECM *(extracellular matrix) (Sheu i wsp. 2006; Yamaoka i wsp. 2006; Magalhaes i Reis 2010; Naughton i wsp. 2013).*

- **Uszkodzenie ścisłych połączeń międzykomórkowych**

Komórki nabłonkowe żołądka tworzą barierę między światłem narządu a przestrzenią śródmiąższową. Połączenia szczytowe między komórkami mają kluczowe znaczenie w utrzymaniu podstawowych funkcji komórek nabłonkowych, takich jak polarność, przyleganie, proliferacja i ruch *(Amieva i El-Omar 2008).* Integralność bariery nabłonkowej zależy w szczególności od połączeń międzykomórkowych, które są kompleksami wielobiałkowymi odgrywającymi istotną rolę w regulowaniu dyfuzji przez nabłonek. Szczelne połączenia są zbudowanie z różnych białek tworzących rusztowania, takich jak ZO-1, łączące cząsteczki adhezyjne-JAM *(junctional adhesion molekule)* -1, klaudyna czy okludyna. Szczelne połączenia międzykomórkowe stanowią cel dla wielu patogenów bakteryjnych. Niektóre bakterie otwierają połączenia komórkowe, podczas gdy inne zaburzają polaryzację komórek nabłonka, odsłaniają brzeżną powierzchnię i w ten sposób powodują nieszczelność nabłonka. Pałeczki *H. pylori* zakłócają funkcjonowanie połączeń komórek nabłonka, polaryzację komórek poprzez wiązanie

się z ich receptorami i stymulację różnych szlaków sygnałowych *(Amieva i El-Omar 2008)*. Jednym z czynników *H. pylori* o takich właściwościach modulujących jest białko CagA, które ulega translokacji do komórek nabłonkowych *(Fisher i wsp. 2009).* CagA wchodzi w interakcje z białkami ścisłych połączeń: E-katcheryną, ZO-1 i JAM zaburzając ich strukturę. β-katenina, która jest zlokalizowana w złączach komórek tworzy, kompleks z przezbłonowym białkiem E-kadheryną. Kompleks E-kadheryna/β-katenina odgrywa istotną rolę w wzajemnych oddziaływaniach komórek nabłonka oraz w utrzymaniu prawidłowej architektury tkanki nabłonkowej. Podczas zakażenia *H. pylori,* ulegające translokacji białko CagA destabilizuje kompleks E-kadheryna/β-katenina, w sposób niezależny od fosforylacji *(Murata-Kamiya i wsp. 2008),* konkurując z β-kateniną o wiązanie z kadheryną. Zakłócenie tworzenia kompleksów E-kadheryna/β-katenina prowadzi do uwolnienia kadheryny z kompleksu, nagromadzenia β-kateniny w cytoplazmie i jądrze oraz aktywacji β-katcheryny za pośrednictwem kareniny, co indukuje transformację komórek nabłonka żołądka *(Murata-Kamiya i wsp. 2007).* CagA może zaburzać polaryzację błony komórek nabłonka żołądka także w wyniku interakcji z kinazą - PAR1 *(protease-activeted receptor)*/MARK *(miogen-activated protein kinase),* która utrzymuje polaryzację komórek poprzez fosforylację białek związanych z mikrotubulami (MAP) *(Saadat i wsp. 2007; Lu i wsp. 2009; Tan i wsp. 2009).*

- **Indukacja apoptozy**

Apoptoza jest wysoce konserwatywnym i regulowanym endogennie procesem śmierci komórkowej zarówno w zdrowej, jak i objętej procesem zapalnym tkance. Pomaga w utrzymaniu homeostazy tkankowej poprzez usuwanie uszkodzonych lub zakażonych komórek *(Jiang i wsp. 2004).* Natomiast procesy migracji i proliferacji komórek mają na celu regenerację uszkodzonej tkanki, choć niekontrolowana aktywność proliferacyjna komórek może promować gromadzenie się szkodliwych mutacji i powstanie zamian nowotworowych *(Vogiatzi i wsp. 2007).* Podczas zakażenia *H. pylori,* zarówno tempo usuwania komórek nabłonkowych na drodze apoptozy i ich odnowy wskutek proliferacji, są wysokie ponieważ procesy te stanowią mechanizmy obronne gospodarza przed utrwaleniem się zakażenia. Przypuszca się, że pałeczki *H. pylori* wykształciły mechanizmy powodujące zachwianie równowagi pomiędzy usuwaniem komórek nabłonka żołądka na drodze apoptozy a ich

proliferacją, co może ułatwić kolonizację i przeżycie tych bakterii i sprzyjać rozwojowi zmian nowotworowych *(Xia i wsp. 2001; Fukiu i wsp 2003; Mimuro i wsp. 2007; Saberi i wsp. 2012).* Wykazano, że niektóre czynniki wirulencji *H. pylori* takie jak komponenty powierzchnowe zawarte w ekstrakcie glicynowym - EG (*glycine acid extract)*, a także UreA i CagA stymulowały migrację i proliferację komórek ludzkiej linii nowotworowej żołądka AGS, jednak nie powodowały nasilenia apoptozy *(Mnich i wsp. 2016).* W innych badaniach wykazano, że białko CagA, które stymulowało proliferację komórek nabłonkowych, hamowało propagację limfocytów T krwi obwodowej *(Paziak-Domańska i wsp. 2000).* Również inne czynniki wirulencji *H. pylori* takie jak BabA stymulowały proliferację komórek nabłonkowych żołądka przy jednoczesnym zmniejszeniu ich oporności na apoptozę *(Yu i wsp. 2005; Tavares i wsp. 2015).*

Hipotezy dotyczące przyczyn apoptozy komórek nabłonkowych żołądka w zakażeniu *H. pylori* są sprzeczne. Sugeruje się, że pałeczki *H. pylori* wywołują apoptozę komórek nabłonka żołądka w celu stymulacji ich proliferacji jako mechanizmu kompensacyjnego oraz regulują te procesy celem wykorzystania komórek nabłonka jako niszy do własnej replikacji *(Ashkrorab i wsp. 2008; Iwai i wsp. 2007; Mimuro i wsp. 2007).* Na podstawie badań na modelu zwierzęcym mysoskoczków sugeruje się także, że zakżenie *H. pylori* wyzwala w komórkach nabłonkowych żołądka mechanizmy przeżycia, zależne od ścieżki p – ERK - zależnej oraz wydzielanie białka antyapoptotycznego - MCL1 *(antiapoptotic protein),* w celu zablokowania apoptozy i utraty komórek, co sprzyjałoby nasilenieu kolonizacji *H. pylori (Mimuro i wsp. 2007).* Można sugerować, iż nasilenie apoptozy komórek nabłonkowych żołądka w zakażeniu *H. pylori* może stanowić mechanizm ograniczający rozwój reakcji zapalnej i eliminujący uszkodzone komórki, a nasilona aktywność proliferacyjna komórek nabłonkowych w odpowiedzi na zakażenie służy regeneracji uszkodzonego nabłonka.

Białko CagA, będące jednym z głównych czynników wirulencji *H. pylori* zaburza szlaki transdukcji sygnału w komórkach gospodarza *(Odenbreit i wsp. 2000).* Dzieje się tak poprzez zależną od CagA aktywację różnych czynników transkrypcyjnych, m.in. NF-κB, jądrowego czynnika aktywowanych komórek T – NFAT (*nuclear factor of activated T cells),* czy wzmacniającego czynnika

limfatycznego/limfoidalnego *(Xi i wsp. 2002; Amieva i wsp. 2008; Wessler i wsp. 2008).* Stymulacja tych czynników transkrypcyjnych prowadzi do wzmorzonego wytwarzania cykliny D1 w komórkach nabłonka i nasilenia ich proliferacji *(Chang i wsp. 2006).* Inny mechanizm indukowania proliferacji komórek nabłonka żołądka w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* jest związany z nasileniem wytwarzania przez nie czynnika hamującego migrację makrofagów - MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) *(Beswick i wsp. 2006).* N – końcowa cześć białka CagA oddziałuje z supresorowym białkiem p53- ASPP2 *(apoptosis-stimulating of p53 protein 2)* stymulującym apoptozę komórek guzów i w ten sposób hamuje apoptozę *(Backert i wsp. 2011)*. Potencjalnie zakażenie *H. pylori* może doprowadzać do uszkodzenia błony śluzowej żołądka na drodze apoptozy przez zwiększenie ekspresji Fas w komórkach nabłonka żołądka i nasilenie oddziaływania Fas z ligandem FasL na infiltrujących nabłonek limfocytach T *(Wang i wsp. 2000).* To wskazuje na rolę komórek odpornościowych w indukcji apoptozy komórek nabłonka żołądka podczas zakażenia *H. pylori (Kuck i wsp. 2001; Negrate i wsp. 2001).* Wykazano znaczenie w tym procesie interakcji z TNF (*zwany także Apo2L)* z cząsteczką – TRAIL *(TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Thomas i wsp. 1998; Kayagaki i wsp. 1999; Wu i wsp. 2004, 2007; Lin i wsp. 2014).*

- **Rola stresu oksydacyjnego**

Stres oksydacyjny to zachwianie równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu ROS a zdolnością antyoksydacyjną organizmu. Wolne rodniki powstają w wyniku aktywacji układu odpornościowego lub innych typów komórek spoza tego układu, przez czynniki endogenne lub egzogenne. Wolne rodniki tlenowe, a także reaktywne formy azotu, biorą udział w procesach fizjologicznych zachodzących w organizmie takich jak: różnicowanie, proliferacja, wzrost, czy apoptoza komórek *(Evans and Cooke 2004; Valko i wsp. 2005; Chandra i wsp. 2015).*

Podczas zakażenia *H. pylori* w błonie śluzowej żołądka produkowane są ROS, które mogą wpływać na wewnątrzkomórkowe przekazanie sygnałów *(Ding i wsp. 2007; Calvino-Fernandez i wsp. 2008; Hand i wsp. 2011),* a wiadomo, że *w*ewnątrzkomórkowa akumulacja ROS przyczynia się do rozwoju nowotworów *(Liou*

i Storz 2010). Wykazano, że VacA i CagA nasilają wytwarzanie ROS *(Hofseth i wsp. 2003; Tsugawa i wsp. 2012).* Dla porównania *Hartog i wsp.* wykazali brak znaczącego wpływu VacA na produkcję ROS, natomiast potwierdzili znaczenie białka CagA *(Hartog i wsp. 2016).* Stres oksydacyjny związany z zakażeniem *H. pylori* może skutkować uszkodzeniem DNA komórek nabłonka żołądka, w powiązaniu z nasileniem apoptozy i proliferacji *(Jacobson 1996; Clement i Perviaz 1999)*. U pacjentów zakażonych *H. pylori* wykryto zwiększone poziomy ROS, których źródłem były monocyty i makrofagi rekrutowane do błony śluzowej żołądka *(Zhang i wsp. 1997; Drake i wsp. 1998).* Wykazano ponadto, że same pałeczki *H. pylori* mogą produkować ROS, które gromadzą się w komórkach nabłonka żołądka *(Nagata i wsp. 1998; Bagchi i wsp. 2002).* Podczas zakażenia tymi bakteriami wzrasta w komórkach nabłonka żołądka ekspresja i aktywność oksydowanej sperminy, która utlenia poliamidy, występującej co skutkuje uwalnianiem nadtlenku wodoru *(Xu i wsp. 2004).* ROS wytwarzane podczas zakażenia *H. pylori* wzmagają w komórkach nabłonkowych żołądka produkcję IL-6 i aktywację ścieżki sygnałowej - STAT3 *(signal transducer and activator of transcription) (Ruiz i wsp. 1994; Smott i wsp. 2000; Qu i wsp. 2013).* Cząsteczką docelową ścieżki STAT3 jest białko c-Myc, które pośredniczy w transformacji komórek nabłonkowych *(Facchini i wsp. 1998).* Silniejszą ekspresję białka c-Myc wykazano w nabłonku żołądka u pacjentów zakażonych niż niezakażonych *H. pylori (Zhu i wsp. 2008).* Wykazano ponadto, że w hamowaniu stresu oksydacyjnego i obumieraniu komórek podczas zakażenia *H. pylori* pośredniczy białko mitochondrialne-APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease) *(Tell i wsp. 2009; Kaur i wsp. 2015; den Hartog i wsp. 2016).*

Cytokiny i cząsteczki sygnałowe w zakażeniu H. pylori

Podczas zakażenia *H. pylori* komórki nabłonkowe żołądka wydzielają cytokiny prozapalne, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie chorób przewodu pokarmowego wskutek zakażenia tymi bakteriami. Intensywnie wydzielana jest zawłaszcza IL-8, szczególnie w zakażeniach szczepami wytwarzającymi białko CagA, co skutkuje rekrutacją neutrofilów *(Crabtree i wsp. 1994; Salami i wsp. 2003).* Podczas zakażenia *H. pylori* komórki nabłonkowe żołądka wydzielają także: IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-1α, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów - GM-CSF

(*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), białko chemotaktyczne monocytów 1 - MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), czynnk hamujący migrację makrofagów - MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) i tranformujący czynnik wzrostowy beta - TGF-β (*transforming growth factor*) *(Jung i wsp. 1997; Tanahashi i wsp. 2000; Beswick i wsp. 2006).* Również podjednostka UreB ureazy po związanu się z cząsteczką CD74 na komórkach nabłonka żołądka aktywuje czynnik NF-κB i wydzielanie IL-8 *(Smita i wsp. 1995; Beswick i wsp. 2006).* Wykazano, że występowanie u bakterii *cag*PAI i OipA jest skorelowane ze wzrostem produkcji IL-6 *(Salami i wsp. 2003).* Długotrwała kolonizacja komórek nabłonkowych żołądka przez pałeczki *H. pylori* skutkuje rozwojem przewlekłej reakcji zapalnej. Do potencjalnych cząsteczek zaangażowanych w rozwój reakcji zapalnej należą: metaloproteinazy - MMP *(metaloproteinase),* w tym MMP-9.

- **MMP-9**

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej to rodzina metalozależnych proteaz degradujących ECM błon podstawnych, co ułatwia migrację komórek oraz regulujące aktywność cytokin i chemokin. Wyróżnia się 5 typów MMP wydzielniczych i 3 związane z błonami komórkowymi *(Haq i wsp. 2000).* MMP zawierają atom cynku (Zn^{2+}), który pełni w cząsteczce enzymu zarówno rolę katalityczną jak i strukturalną. MMP syntezowane są w komórkach, w formie proenzymów i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jako dojrzałe enzymy. Inaktywowane są przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz - TIMP *(tissue inhibitors of metaloproteinases*) *(Borkakoti 2000).* MMP-9 reguluje zarówno procesy fizjologiczne jak i patologiczne w ludzkim organizmie, a jej główną funkcją jest degradacja ECM i błon podstawnych. W warunkach fizjologicznych, uczestniczy w angiogenezie, przebudowie tkanek oraz embriogenezie. MMP-9 bierze udział w nowotworzeniu, w rozwoju choroby Altzheimera oraz chorób układu sercowo-naczyniowego *(Colins i wsp. 2001; Hrabec i wsp. 2007).* MMP-9 degraduje kolagen typu IV, który jest głównym składnikiem naczyniowej błony podstawnej. Uszkodzenie tej bariery umożliwia migrację komórek m.in. leukocytów podczas reakcji zapalnej, a także angiogenezę i przerzutowanie komórek nowotworowych. Ponadto wskutek degradacji ECM komórki są izolowane od sygnałów z otoczenia na skutek zniszczenia oddziaływań z macierzą.

Naturalnym źródłem MMP-9 w organizmie gospodarza są neutrofile, a także monocyty i makrofagi. We wczesnych etapach reakcji zapalnej, MMP-9 jest wydzielana przez leukocyty tkankowe, jednak głównym jej źródłem są neutrofile, w których jest magazynowana w II - gich i III - cio rzędowych ziarnitościach podczas ich dojrzewania. MMP-9 obniża zdolność limfocytów T do odpowiedzi na IL-2, która jest ich czynnikiem wzrostowym. Aktywują także IL-8 oraz czynnik płytkowy (PF-4*) (Reis i wsp. 2012).* Ze względu na źródła MMP-9 i zdolność pobudzenia IL-8 (jednej z kluczowych cytokin w zakażeniu tymi bakteriami), poszukuje się zależności pomiędzy nasileniem wytwarzana MMP-9 a rozwojem przewlekłej reakcji zapalnej towarzyszącej zakażeniu *H. pylori*. W hodowlach komórkowych stymulowanych *H. pylori in vitro* wykazano podwyższoną ekspresją mRNA MMM-9 *(Mori i wsp. 2003).* Transkrypcja genu MMP-9 wymaga aktywacji NF-kB, AP-1 lub SP-1, w zależności od rodzaju komórek i bodźców środowiskowych. Fragmenty genu MMP-9, odpowiadające na zakażenie *H. pylori,* znajdują się w obrębie sekwencji regulatorowych 5' MMP-9 (670-599 par zasad) *(Mori i wsp. 2003; Rautelin i wsp. 2009; Li i wsp. 2013). Oliverira i wsp*. wykazali, że poprzez T4SS zwiększa się aktywność MMP-9 w odpowiedzi na kolonizację komórek nabłonkowych żołądka przez pałeczki *H. pylori (Oliverira i wsp. 2006).* W zakażeniu *H. pylori* źródłem MMP-9 oprócz neutrofilów są także monocyty. Natomiast makrofagi produkują IL-1β, IL-8, TNF-α oraz INF-ɣ, które zwrotnie indukują wytwarzania produkcję MMP-9.

- **Czasteczki alarmowe i ich rola w utrzymaniu homeostazy**

Komponenty własnych komórek organizmu, powstałe podczas uszkodzenia tkanek oraz wydzielane przez nie mediatory, stanowią sygnały alarmowe dla układu podpornościowego. Do takich cząsteczek sygnałowych należą tzw. wzorce molekularne związanie z uszkodzeniem - DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), które sygnalizują wrodzony układ odpornościowy o zaburzeniu homeostazy tkankowej. DAMPs takie jak dwuniciowy DNA, białko o dużej modilności-HMGB-1 (*high mobility group box protein-1*), białko Box-1, ATP, kryształy cholesterolu, IL-1β, IL-33, Hsp, białko NAP, mitochondrialne DNA lub mitochondrialne peptydy N-formylowe są wydzielane przez komórki w odpowiedzi na stres, zaburzenie integralności błony komórkowej lub gdy komórka ulega

martwicy *(Kono i wsp. 2008).* Wiele DAMPs stymuluje receptory rozpoznające wzorce patogenów – PRR *(pathogen recognition receptors),* takie jak TLR lub cytoplazmatyczne receptory Nod-podobne-NLR (*nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor) (Shi i wsp. 2003).* Wiele komórek, w tym makrofagi, komórki dendrytyczne, fibroblasty, komórki nabłonkowe i śródbłonkowe, jak również naturalne komórki cytotoksyczne NKT (*natural killer)* posiadają takie receptory powierzchniowe umożliwiające uruchamiane ścieżek sygnalizacyjnych uruchamiane w celu inicjacji reakcji zapalnej, w odpowiedzi na „sygnały niebezpieczeństwa". Poprez TLR2 białko NAP *H. pylori* pobudza komórki odpornościowe do produkcji IL-12 oraz IL-8, a także nasila adhezję neutrofilów i monocytów do komórek nabłonka żołądka. *(Nishioka i wsp. 2003).* NAP pobudza również komórki tuczne do wydzielania IL-6, a monocyty do produkcji IL-23, która umożliwia ich różnicowanie w dojrzałe komórki dendrytyczne zdolne do prezentacji antygenów *(Amadei i wsp. 2006).*

W odpowiedzi na uszkodzenie tkanek spowodowane np. działaniem czynników zakaźnych z jąder komórek nabłonkowych i śródbłonkowych uwalniana jest IL-33, pełniącą funkcję endogennej czasteczki alarmowej, która informuje komórki odpornościowe o zaburzeniu homeostazy w otaczających tkankach. Pierwotnie IL-33 została zidentyfikowana jako produkt genu DVS27, regulujący skurcz naczyń mózgowych u psów *(Onda i wsp. 1999)* oraz jako czynnik jądrowy komórek wysokiego śródbłonka - NF-HEV *(nuclear factor high entothelial venule) (Baekkevold i wsp. 2003).* Zaliczana jest do cytokin nadrodziny IL-1, która i aktywuje m.in. naturalne komórki limfoidalne typu 2 - ILC2 *(innate lymphoid cells 2).*

Intensywne wytwarzania IL-33 wykazano w żołądku, płucach, rdzeniu kręgowym, mózgu i skórze, natomiast niskie stężenie tej cytokiny wykazano w tkance limfatycznej, w śledzionie a także w trzustce, nerkach i sercu. Różne bodźce nasilają wytwarzanie IL-33, głównie poprzez ścieżki sygnałowe za pośrednictwem receptorów TLR *(Lei wsp. 2013).* IL-33 może działać jako tradycyjna cytokina lub jako czynnik transkrypcyjny, jednak wiedza na temat jej roli podczas zakażeń H*. pylori* jest niewystarczająca. Cytokina ta odgrywa istotną rolę w rozwoju odpowiedzi zależnej od limfocytów Th2, a w mniejszym stopniu od limfocytów Th1. Jednak rodzaj

aktywowanych komórek zależy od mikrośrodowiska oraz rodzaju cytokin obecnych w otaczającej tkance *(Miller, 2011; Noto i Peek, 2015).* Podczas martwicy, uwalniana jest pełnowymiarowa cząsteczka IL-33 o pełnej długości, pełniąca rolę prozapalnej alarminy. Natomiast, podczas apoptozy IL-33 jest cięta przez kaspazy-3/7, co prowadzi do hamowania jej działania prozapalnego. IL-33 jest endogennym ligandem dla receptora ST2 w formie rozpuszczalnej (sST2) lub izoformy przezbłonowej (ST2L). Aktywna IL-33 może tworzyć kompleks z ST2L na komórkach docelowych, a jej aktywność może być hamowana przez sST2 *(Lee i wsp., 2013).*

IL-33 jest magazynowana w komórkach w formie nieaktywnej. Na zewnątrz komórki wydzielana jest pod wpływem kaspazy-1 i dopiero po połączeniu ze swoistymi receptorami przezbłonowymi ST2L tworzy kompleks IL-33/ST2L, który ulega aktywacji. Za pośrednictwem koreceptora IL-1RAcP, kompleks IL-33/ST2L aktywuje komórki układu odpornościowego (granulocyty, mastocyty, monocyty, makrofagi, komórki NK i NKT), poprzez białko MyD88 i czynniki transkrypcyjne-IRAK1 *(Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) oraz IRAK4. Aktywowana jest ścieżka sygnalizacyjna czynnika 6 zależna od receptora TNF - *TRAF (TNF receptor–associated factor 6),* NF-κβ i kinazy MAP. Skutkiem aktywacji tej ścieżki sygnałowej jest produkcja mediatorów prozapalnych takich jak: IL-5, IL-13 *(Schmitz i wsp. 2003).* IL-33 aktywuje wrodzony układ odpornościowy, nasila migrację neutrofilów i eozynofilów, w połączeniu z MMP-9 polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu M2. Choć prawdopodobnie główną rolą IL-33 jest indukcja procesów obronnych gospodarza przed czynnikami zakaźnymi, to jednak aktywacja przez IL-33 różnych komórek odpornościowych w tym granulocytów obojętnochłonnych i eozynofilów, może nasilać odpowiedź zapalną i sprzyjać rozwojowi chorób o podłożu zapalnym zależnych od tej reakcji zapalnej *(Le i wsp. 2013; Pastorelli i wsp. 2013).* Wykazano, że IL-33 nasila odpowiedź limfocytów Th2, Th17 i możliwe, że także odpowiedź zapalną Th1. Sugeruje się jej znaczenie w rozwoju chorób nowotworowych i autoimmunizacyjnych *(Lopetuso i wsp. 2012; Jovanovic i wsp. 2011; Kuroiwa i wsp. 2001; Lopez-Casado i wsp. 2015).* Możliwość modulacji szlaku IL-33/ST2 stanowi obiecującą strategię terapeutyczną, sugerowaną w leczeniu i zapobieganiu chorób zapalnych. Jednak wiele fundamentalnych pytań dotyczących biologii IL-33 nadal wymaga odpowiedzi.

Rola IL-33 w przebiegu zakażeń *H. pylori* jest słabo poznana. Sugerowane jest zarówno jej działanie pro- jak i przeciwzapalne. Wykazano, że IL-33 jest wytwarzana w błonie śluzowej żołądka, gdzie silnie aktywuje odpowiedź odpornościową typu Th2, co może mieć istotny wpływ na przebieg zakażenia *H. pylori.* Z drugiej strony wytwarzanie przez komórki odpornościowe IL-33 w przewlekłym zakażeniu *H. pylori,* może być przyczyną polaryzacji układu odpornościowego w kierunku odpowiedzi typu Th1. Taki rodzaj silnie prozapalnej odpowiedzi dominujący podczas zakażenia *H. pylori* prawdopodobnie prowadzi do progresji stanów przedrakowych *(Buzzelli i wsp. 2015).*

Wyniki badań *Buzzelli i wsp.* podczas ostrego zakażenia *H. pylori,* poziom IL-33 ulega obniżeniu, natomiast nasilen przewlekłą infekcję charakteryzuje wzrost jej wytwarzania *(Buzzelli i wsp. 2015*). Kontynuacja badań nad rolą IL-33 w przebiegu zakażeń *H. pylori* jest niezbędna w celu poznania mechanizmów regulujących wytwarzanie i wydzielanie tej cytokiny, a także mechanizmów jej działania na poziomie bariery nabłonkowej żołądka.

Rozwój procesów odpornościowych podczas zakażenia H. pylori

Rekcja zapalna tocząca się w błonie śluzowej żołądka podczas zakażenia *H. pylori* charakteryzuje się różnym nasileniem. U większości osób zakażonych *H. pylori* zakażenie jest bezobjawowe. Szacuje się, że u ok. 10% osób zakażonych *H. pylori* w początkowej fazie zakażenia rozwija się nadmierna ostra reakcja zapalna, która wraz z utrwaleniem infekcji staje się przewlekła *(Peek i wsp. 2002; Gebert i wsp. 2003)*. Długotrwała kolonizacja komórek nabłonkowych żołądka przez *H. pylori* wynika z nieskutecznych mechanizmów efektorowych odpowiedzi odpornościowej gospodarza, jak i licznych czynników wirulencji tych bakterii, modulujących przebieg tych procesów.

Pierwszą linią obrony organizmu skierowaną przeciwko patogenom jest odpowiedź wrodzona (nieswoista). W rozpoznaniu wzorców molekularnych drobnoustrojów (PAMP) pośredniczą receptory PRR. PPR stanowią rodzinę białek błonowych o domenach cytoplazmatycznych i zewnętrzkomórkowych. Do rodziny tych białek zaliczane są: receptory TLR oraz NOD *(Nikronow i wsp. 2008).* Po

wniknięciu do organizmu gospodarza struktury powierzchowne *H. pylori* zostają rozpoznane przez powierzchniowe receptory TLR występujące na komórkach nabłonkowych żołądka oraz na komórkach prezentujących antygeny, co skutkuje wytwarzaniem cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-8 i TNF-α,), m.in. o działaniu chemotaktycznym, które aktywują inne komórki odpornościowe takie jak: granulocyty obojętnochłonne, makrofagi, komórki tuczne oraz komórki dendrytyczne *(Suarez i wsp. 2006)*. Antygeny powierzchniowe *H. pylori* słabiej w porównaniu do innych bakterii Gram-ujemnych, aktywują niektóre receptory. W odniesieniu do receptora TLR5 jest to skutek mutacji łańcucha aminokwasowego w miejscu 89-96 N-terminalnej domeny D1 w białkach flagelinowych. Słaba aktywacja TLR9 jest wynikiem wysokiego stopnia metylacji CpG DNA, a słaba aktywacja TLR4 unikatowej budowy LPS *H. pylori (Schmausser i wsp. 2004; Andersen i wsp. 2005).*

H. pylori kolonizując komórki nabłonkowe żołądka, wydzielają liczne czynniki wirulencji tj., białko OipA oraz ureazę, które do nich wnikają na drodze endocytarnej lub jak CagA są wprowadzane za pośrednictwem systemu sekrecyjnego *(Jonge i wsp. 2004; Viala i wsp, 2004*). Komponenty *H. pylori* aktywując czynniki transkrypcyjne NF-κB i AP-1, stymulują wzmożoną produkcję cytokin prozapalnych, które przyciągają do miejsca zakażenia zarówno komórki odpowiedzi nieswoistej, jak i limfocyty pomocnicze Th1 *(Backert i wsp. 2011).* Napływające makrofagi i KD wydzielają IL-1, TNF-α, IL-6, a także IL-12, która pobudza limfocyty typu Th1 do produkcji INF- γ *(Wilson i Crabtree 2000; Bäckhed i wsp. 2003; Wessler i wsp. 2008).* Limfocyty Th1 dominują u pacjentów z objawowym zapaleniem, dzieje się tak dlatego, że aktywowane makrofagi nasilają ekspresję czynnika MIF, w komórkach nabłonkowych i leukocytach, co skutkuje migracją neutrofilów i makrofagów do miejsca zapalnego *(Hua-Xiang i wsp. 2004; Wilson i Cabtree 2007; Schwartz i wsp. 2008; Wang i wsp. 2010*). Choć pałeczki *H. pylori* aktywują makrofagi, to pewne czynniki wirulencji *H. pylori* takie jak Hsp, czy VacA indukując apoptozę hamują ich aktywność fagocytarną. Ponadto *H. pylori* mają zdolność przeżycia wewnątrz granulocytów dzięki wytwarzaniu kalazy, która neutralizuje ROS *(Ramarao i Meyer 2001; Grębowska 2008*). Pałeczki *H. pylori* zlokalizowane wewnątrz makrofagów indukują wydzielane przez nie IL-10, która zwrotnie hamuje aktywność innych komórek odpornościowych, co sprzyja utrwaleniu zakażenia.

Do komórek odpornościowych pierwszej lini obrony należą również komórki NK, zaliczane do grupy ziarnistych limfocytów, wykazujących silne właściwości cytotoksyczne. Występują w tkankach limfatycznych i nielimfatycznych, a także w krwi i limfie. Ulegają aktywacji podczas zakażenia *H. pylori* w środowisku cytokin, przyczyniając się do uszkodzenia komórek nabłonkowych żołądka na drodze zależnej od perforyn i grazymów *(Rudnicka i wsp. 2012).* Komórki NK mogą działać cytotoksycznie w sposób pośredni, np. poprzez mechanizm cytotoksyczności zależnej od przeciwciał ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Ich działanie cytotoksyczne wiąże się też z wytwarzaniem IL-12 i INF-γ, które nasilają ekspresję antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I na komórkach APC, aktywujące neutrofile oraz cytotoksyczne limfocyty T $CD8^+$-CTL (*cytotoxic-T lymphocyte*) *(Wang i wsp. 2000; Copier i wsp. 2001; Yun i wsp. 2005*). Nie tylko komórki NK, ale także KD aktywowane przez białko CagA na szlaku sygnałowym STAT3, wytwarzają przeciwzapalną IL-10 i TGF-β. Cytokiny te promują dojrzewanie limfocytów T regulatorowych - Treg (*regulatory T cells*), wyciszających odpowiedź odpornościową *(Kranzer i wsp. 2004; Cheng i wsp. 2012; Kaebisch i wsp. 2014).* Na powierzchni KD występują także receptory lektynowe DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), które rozpoznają reszty cukrowe patogenów, np. determinanty Le *H. pylori*. Najprawdopodobniej, oddziaływania Le-DC-SIGN skutkują wzmożoną produkcją IL-10 przez komórki dendrytyczne i zahamowaniem dopowiedzi immunologicznej typu komórkowego, doprowadzając do trwałej kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka przez *H. pylori (Geijtenbeek i wsp. 2002; Appelmelk i wsp. 2003; Bergman i wsp. 2004; Cambi i Figdor 2005).*

Odpowiedź adaptacyjna swoista na zakażenie *H. pylori* charakteryzuje się udziałem zarówno limfocytów T jak i B. W nabłonku żołądka osób zakażonych powstają pęcherzyki limfoidalne, które składają się z limfocytów T pomocniczych $CD4^+$ otaczających limfocyty B *(Genta i wsp. 1993).* W odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* do błony śluzowej żołądka migrują limfocyty T pomocnicze $CD4^+$ a w mniejszym stopniu cytotoksyczne $CD8^+$ *(Strömberg i wsp. 2003; Miszczyk i wsp. 2014).* Limfocyty T $CD4^+$ sprzyjają rozwojowi reakcji zapalnej przewlekłej, natomiast limfocyty $CD8^+$ (przy braku limfocytów $CD4^+$) prawdopodobnie inicjują reakcję obronną organizmu *(Tan i wsp. 2008).* U osób z chorobą wrzodową żołądka podczas

zakażenia *H. pylori* dominuje popoluacja limfocytów Th1 i charakterystyczne dla tego typu odpowiedzi cytokiny: IL-12, IFN-γ i TNF-α. Natomiast w przewlekłym zapaleniu żołądka dochodzi do zrównoważenia cytokin Th1 przez cytokiny Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 IL-10) *(Miszczyk i wsp. 2012)*. Zaobserwowano także wzrost produkcji IL-17 przez limfocyty Th17. Cytokina ta pobudza fibroblasty oraz komórki nabłonkowe śródbłonka naczyniowego do wydzielania cytokin pobudzających napływ neutrofilów tj.: IL-8, IL-1β, TNF-α i IL-6 (*Korn i wsp. 2009).*

Podczas zakażenia *H. pylori* rozwija się nie tylko miejscowa ale także uogólniona reakcja zapalne i odpowiedź adaptacyjna na zakażenie. Charakterystyczną cechą odpowiedzi miejscowej jest produkcja swoistych przeciwciał klasy IgG oraz wydzielniczych sIgA. Mogą być także wytwarzane swoiste IgE. We wczesnej fazie zakażenie dominują przeciwciała klasy IgM natomiast IgA i IgG świadczą o zakażeniu przewlekłym *(Berstad i wsp. 1999; Urita i wsp. 2004; Matusiak i wsp. 2016)*. Potencjalnie wydzielnicze sIgA, hamują aktywność ureazy, VacA oraz adhezji bakterii do komórek nabłonka żołądka *(Berstad i wsp. 1999; Cover 1996).* Jednakże ich działanie jest ograniczone ze względu na hamowanie przez komponenty *H. pylori* tworzenia hetero-dimerów sIgA. Natomiast powstające podczas zakażenia przeciwciała klasy IgE swoiste wobec *H. pylori* przyłączają się do receptorów komórek tucznych, powodując ich degranulację, uwolnienie histaminy i nasilenie reakcji zapalnej *(Aceti i wsp. 1991).* Specyficzne przeciwciała klasy IgG i IgA przeciw białkom *H. pylori* tj. ureaza (UreA i UreB), flagellina (FlaA i FlaB), CagA, Hsp, Hap A (HpaA, *H. pylori adhesin A*), są wykrywane u większości zakażonych osób *(Rechciński i wsp. 1997; Chmiela i wsp. 2003; Suarez i wsp. 2006; Matusiak i wsp. 2016).* Jednak nie stanowią skutecznej obrony organizmu przed rozwojem infekcji *H. pylori,* ze względu na miejsce bytowania bakterii *(Morton i wsp. 1996).*

Kawia domowa jako model doświadczalny w zakażeniu H. pylori

Pomimo wielu lat badań liczne aspekty zakażeń *H. pylori* u ludzi pozostają niewyjaśnione. Wynika to z faktu, że u człowieka bardzo często infekcja przebiega w sposób bezobjawowy. Ograniczona jest także możliwość otrzymywania od ludzi materiału biologicznego do badań. Ze względów etycznych nie można w sposób celowy wywoływać u ludzi zakażenia. Modele zwierzęce stosowane w oparciu

o ustalone zasady etyczne umożliwiają prześledzenie naturalnej historii zakażenia *H. pylori* i poznanie mechanizmów molekularnych oraz komórkowych warunkujących proces chorobowy. Do badań nad przebiegiem zakażeń *H. pylori* stosowane są następuje modele: psy, koty, myszy, szczury, myszoskoczki mongolskie, kawie domowe oraz ssaki z rodzaju naczelnych. Zwierzęta muszą być podatne na zakażenie i kolonizację przez pałeczki *H. pylori,* odzwierciedlać objawy chorobowe występujące u ludzi i nie mogą być naturalnym rezerwuarem bakterii z rodzaju *Helicobacter.* Ponadto, budowa przewodu pokarmowego oraz pewne komponenty żywieniowe zwierząt powinny być zbliżone do tych, które występują u ludzi *(Pautahidis i wsp. 2001).* Najdogodniejszym modelem spośród wymienionych zwierząt laboratoryjnych jest kawia domowa (*Cavia porcellus*). Są to zwierzęta o niewielkich rozmiarach i łatwe w hodowli. Ponadto żołądek kawii jest całkowicie pokryty nabłonkiem gruczołowym, a budowa gruczołów jest bardzo podobna do struktury gruczołów żołądkowych u ludzi *(Sjunnesson i wsp. 2003).* Po zakażeniu kawii *H. pylori,* szybko rozwija się stan zapalny błony śluzowej żołądka, który jest możliwy do potwierdzenia badaniami histologicznymi *(Miszczyk i wsp. 2014).* Komórki nabłonkowe żołądka kawii domowych wytwarzają homolog ludzkiej IL-8, cytokiny przyciągającej neutrofile, które współuczestniczą w rozwoju patologicznej reakcji zapalnej, towrzyszącej zakażeniu *H. pylori.* Ponadto, kawie posiadają mechanizmy odpowiedzi odpornościowej nieswoistej m.in. dopełniacz i są podatne na rozwój odpowiedzi adaptacyjnej swoistej typu komórkowego. Podobnie jak ludzie wymagają dostarczenia w pożywieniu witaminy C. Nie są naturalnym rezerwuarem pałeczek z rodzaju *Helicobacter (Sjunnesson i wsp. 2003).* Pomimo wielu zalet model kawii domowej posiada także pewne wady, do których należą m.in. mała dostępność specyficznych odczynników oraz wysoki poziom enzymów trawiennych w przewodzie pokarmowym *(Miszczyk i wsp. 2014).*

Cel pracy

Pomimo wielu lat badań wiedza na temat patogenezy zakażeń *H. pylori* u ludzi, w tym patofizjologii inicjowanej przez nie reakcji zapalnej, oraz rozwoju procesów odpornościowych jest niewystarczająca. Wciąż nie wiadomo dlaczego zakażenia *H. pylori* mają zróżnicowany przebieg, począwszy od zakażeń bezobjawowych poprzez wrzody żołądka lub dwunastnicy, a także raka żołądka. Wiadomo, że komponenty *H. pylori* uwalniane aktywnie, lub wskutek rozpadu pałeczek *H. pylori* podczas zakażenia błony śluzowej żołądka, zaburzają stabilność tej bariery, co skutkuje rozwojem patologicznej reakcji zapalnej. Zaburzenie homeostazy powinno prowadzić do zaalarmowania układu odpornościowego gospodarza celem naprawy uszkodzeń oraz eliminacji czynnika zakaźnego. Jednakże, podczas zakażenia *H. pylori* reakcja zapalna która jest początkowo ostra, z czasem staje się przewlekła. To może sugerować udział nie tylko czynników wirulencji patogenu ale także czynników endogennych gospodarza w utrwaleniu stanu zapalnego. Mechanizmy sygnałowe mobilizujące układ odpornościowy gospodarza do eliminacji czynnika zakaźnego i regeneracji uszkodzeń nabłonka żołądka nie są dobrze poznane.

Wiedza na temat naturalnej historii zakażenia *H. pylori* jest kluczowa dla przewidywania i zapobiegania skutkom takich zakażeń. Obejmuje ona znajomość mechanizmów rozwoju przewlekłej reakcji zapalnej, zarówno miejscowej, jak i uogólnionej, z uwzględnieniem czynników patogenu i gospodarza. W poznaniu naturalnej historii zakażenia *H. pylori* niezwykle cenne są badania *in vivo* na modelach zwierzęcych, dzięki którym można śledzić procesy odpornościowe na poszczególnych etapach zakażenia. Natomiast badania *in vitro* umożliwiając ocenę zmian, inicjowanych w odpowiedzi na komponenty *H. pylori,* zachodzących na poziomie komórkowym. Zatem połączenie obu typów badań umożliwia kompleksową ocenę efektów interakcji pałeczek *H. pylori* z komórkami gospodarza.

Celem pracy była ocena efektów oddziaływania pałeczek *H. pylori* oraz dobrze zdefiniowanych rozpuszczalnych komponentów tych bakterii na komórki bariery nabłonkowej żołądka, w kontekście uszkodzenia tej bariery, rozwoju reakcji zapalnej, inicowania procesów naprawczych i procesów odpornościowych. Cel pracy realizowano w badaniach *in vivo* na modelu doświadczalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych oraz w badaniach *in vitro* na modelach komórkowych:

pierwotnych komórkach nabłonkowych żołądka oraz fibroblastach kawii domowej, w dwóch blokach tematycznych:

Część I. Efekty oddziaływania *H. pylori* na barierę nabłonkową żołądka w zakresie:

- Kolonizacji i utrwalenia zakażenia
- Destabilizacji bariery nabłonkowej żołądka
- Zaburzenia procesów naprawczych **[publikacja I - III]**.

Część II. Ogólnoustrojowe konsekwencje zakażenia *H. pylori:*

- Indukcja wytwarzania przeciwciał potencjalnie autorektywnych w następstwie mimikry antygenowej **[publikacja IV i V]**.

Materiały i metody

Materiały

1. Szczep referencyjny *H. pylori*

W badaniach wykorzystano szczep wzorcowy *Helicobacter pylori*, CCUG 17874 z Kolekcji Szczepów Uniwersytetu w Gothenburgu, Szwecja, wytwarzający białka VacA/CagA **[publikacja I, II, III, V].**

2. Podłoża do hodowli *H. pylori*

- Bulion *Brucella* z dodatkiem 10% FCS i antybiotykami (suplement Skirrow: polimyksycyna B – 0,2 mg, wankomycyna – 5 mg, trimetoprim – 2,5 mg)
- Zmodyfikowane podłoże do hodowli *Helicobacter* (*Helicobacter* Agar), (Becton-Dickinson GmbH, Heindelberg, Niemcy)

3. Antygeny *H. pylori*

Jako stymulatory komórkowe pochodzenia bakteryjnego w badaniach *in vitro* zastosowano: ekstrakt glicynowy (EG), białko związane z cytotoksyną A (CagA), podjednostkę UreA ureazy, LPS *H. pylori* lub wzorcowy LPS *E. coli.*

- **EG** –w skład którego wchodzą głównie białka powierzchniowe wzorcowego szczepu *H. pylori* CCUG 17874 o masach: 29 kDa (UreA), 60 kDa (HspB), 66 kDa (UreB), 80 kDa (VacA), 120 kDa (CagA), otrzymywano poprzez ekstrakcję buforem glicynowym 0,2 M o pH 2,2 wg metody Logana i Trusta *(Logan i Trust 1983)*
- **CagA** - rekombinowany fragment białka CagA, kodowany przez gen *cagA* (2777-3465 pz) otrzymano dzięki uprzejmości A. Covacci (IRIS, Siena, Włochy). Białko CagA o masie 26 kDa uzyskiwano w komórkach *E. coli.* Oczyszczono je na kolumnie agarozowej Ni^{2+} -NTA *(Covacci w wsp. 1993).* Jego interakcję z wzorcowymi surowicami odpornościowymi przeciw *H. pylori,* sprawdzano w teście immunoenzymatycznym ELISA *(Xiang i wsp. 1993).*

- **UreA** - ze względu na ochronę patentową białka UreA *H. pylori*, w doświadczeniach użyto rekombinowaną podjednostkę ureazy UreA szczepu *H. acinonychis* wyizolowanego z żołądka geparda, którą otrzymano w ramach współpracy z prof. M. Obuchowkim (Gdańsk, Międzyuczelnany Wydział Biotechnlogii UG). Sekwencja aminokwasowa ureazy *H. acinonychis* jest w 97% zgodna z sekwencją ureazy *H. pylori.* Gen kodujący ureazę amplifikowano metodą PCR, używając jako matrycy chromosomalnego DNA i oligonulkeotydów hisureA-up i hisureA-dn, jako starterów. Otrzymany produkt PCR o wielkości 737 bp trawiono enzymami KpnI oraz NheI i wbudowywano do komercyjnego wektora pBAD. Powstały plazmid, pMD1, użyto do transfekcji szczepu DH5α *E. coli,* który wykorzystano do produkcji UreA, w środowisku arabinozy 0,05%. Otrzymane białko o masie 27 kDa oczyszczono na kolumnie agarozowej Ni-NTA i filtrowano, stosujc żywicę Superose 6. *(Eppinger i wsp. 2006; Hinc i wsp. 2010)* **[publikacja I, II, III].**
- **LPS** – użyto LPS *H. pylori* wyizolowany ze szczepu wzorcowego CCUG 17874, który otrzymano w ramach współpracy z prof. A.P. Moran'em z Instytutu Mikrobiologii Narodowego Uniwersytetu Irlandii w Galway. Lizaty komórek bakteryjnych były wstępnie traktowane proteinazą K *(Moran i wsp. 1992).* LPS ekstrachowano 45% wodnym roztworem fenolu w temp. 68°C, przez 30 minut *(Hitchcock i wsp. 1983).* Oczyszczono poprzez traktowanie RNazą A, DNazą II i proteinazą K oraz poprzez ultrawirowanie przy 100000 × g, w 4°C, przez 18 godzin *(Westphal i wsp. 1952).*
- **LPS** *E. coli* serotyp O55:B5 (Sigma, Stany Zjednoczone).

4. Syntetyczne peptydy i ludzkie białka rekombinowane

- P1 – peptyd zawierający sekwencję aminokwasową występującą w ludzkim białku szoku cieplenego (Hsp) 60 i białku HspB *H. pylori* (aa: 112-121, sekwencja aa: TTTATVLARS) (Lipopharm, Gdańsk, Polska); **[publikacja V];**
- P2 – peptyd nie zawierający wspólnego regionu białka Hsp60 i HspB (aa: 122-131, sekwencja aa: IAKEGFEKIS) (Lipopharm, Gdańsk, Polska) **[publikacja V];**

- Rekombinowana ludzka metaloproteinaza 9 (MMP-9) (BioVision Incorporated, Milpitas, Stany Zjednoczone) **[publikacja II].**

5. Zwierzęta *(Cavia porcellus)*

Na podstawie danych literaturowych, i wcześniejszych badań Zespołu *(Miszczyk i wsp., 2014; Mnich i wsp., 2015; Walencka i wsp., 2015),* wybrano kawie domowe (potocznie świnki morskie), jako model zwierzęcy do wywołania zakażenia *H. pylori*. Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (LKB9: LB646/2012 oraz 58/ŁB45/2016). Kawie domowe rasy himalajskiej, umaszczenia białego, samce lub samice o wadze 500-800 gramów, wolne od drobnoustrojów chorobotwórczych pochodziły z hodowli własnej Zwierzętarni Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, posiadającej uprawnienia do prowadzenia hodowli zwierząt laboratoryjnych i wykonywania badań eksperymentalnych na zwierzętach. Zwierzęta były przetrzymywane w indywidalnych klatkach, karmione standardową paszą i miały stały dostęp do wody pitnej.

5. Linie komórkowe

- Pierwotne komórki nabłonka żołądka wyprowadzone z tkanki żołądka kawii domowej wg procedury opisanej w literaturze *(Terano i wsp. 1982; Evans i wsp. 1992; Stern i wsp. 2012),* w modyfikacji własnej.

- Fibroblasty kawii domowej 104C1 (ATCC® CRL-1405™), transformowane nowotworowo benzopirenem (ATCC, *American Type Culture Collection).*

Komórki użyto w następujących procedurach: gojenia rany (*scratch assay*), oceny cytotoksyczności komponentów bakteryjnych, proliferacji, apoptozy, wytwarzania białek pro- lub anty-apoptotycznych, oceny morfologii jąder komórkowych oraz wyciszania ekspresji genu IL-33.

- Genetycznie zmodyfikowana linia ludzkich monocytów - THP1-Blue™ NF-κB (InvivoGen, San Diego, Stany Zjednoczone), z genem reporterowym wydzielniczej embrionalnej fosfatazy alkalicznej - SEAP (*secreted embryonic alcaline phosphatase*), indukowanym przez aktywację szlaków sygnałowych zależnych od czynnika transkrypcyjnego NF-κB.

Komórki THP1-X Blue™ użyto do oceny NF-κB oraz do oceny zewnątrzkomórkowego wydzielania cytokin TNF-α, IL -1, IL-2 i IL-12, w teście ELISA.

1. Surowice ludzkie

Do badań użyto surowice z kolekcji Pracowni Gastroimmunologii Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego, pochodzące od:

- 90 pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (ChNS), objętych opieką II Kliniki Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w Wojewódzkim Szpitalu im dr. Władysława Biegańskiego, w Łodzi oraz Kliniki Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;
- 28 pacjentów dorosłych z objawami dyspepsji objętych opieką wytypowanej jednostki podstawowej opieki medycznej w Łodzi;
- 47 zdrowych osób dorosłych objętych opieką wytypowanej jednostki podstawowej opieki medycznej w Łodzi;

Kolekcja surowic została stworzona na podstawie zgody Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (RNN/134/13/KE/2-13; 34/KBBN-UŁ/I/2014; 10/KBBN-UŁ/II/2015)

2. Przeciwciała

- Monolkonalne
  - przeciwciała I-rzędowe, mysie anty-MUC5AC (MyBiosource, San Diego, Stany Zjednoczone)
  - przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-Bcl-xL (Cell signaling technology, Massachusetts, Stany Zjednoczone)

- przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-kaspaza 3 (Cell signaling technology, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-Bcl-2 (Abbkine, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-Bax (Abbkine, Waltham, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-p44/42 MAPK (Cell siganaling technology, Stany Zjednoczone)

- Poliklonalne

  Nieznakowane:
  - przeciwciała I-rzędowe, mysie anty-Le^X (Dako, Glostrup, Dania)
  - przeciwciała I-rzędowe, mysie anty-Le^Y (Dako, Glostrup,Dania)
  - przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-4HNE (Bios, San Diego, Stany Zjednoczone)
  - przeciwciała I-rzędowe, królicze anty-IL-33 (TermoFisher, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
  - Przecwiciała I-rzędowe, mysie anty-świńskie CD8 (Gen Probe, Dan Diego, Stany Zjednoczone)
  - przecwiciała I-rzędowe, mysie anty-świńskie CD4 (Gen Probe, San Diego, Stany Zjednoczone)

  Znakowane:
  - przeciwciała kozie przeciwko IgM lub IgG kawii domowej, skoniugowane z HRP (Dako, Glostrup, Dania)
  - przeciwciała królicze anty-*H. pylori,* znakowane FITC (MyBiosource, San Diego, Stany Zjednoczone)
  - przecwciała królicze anty-mysie, 1A8-Ly-6G znakowane FITC (ThermoFisher, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
  - przeciwciała owcze anty-mysie IgG, znakowane FITC (Sigma, St. Luise, Stany Zjednoczone)
  - przeciwciała kozie anty-królicze IgG, znakowane FITC (Invitrogen, San Diego, Stany Zjednoczone)

- przeciwciała kozie anty-królicze IgG, znakowane AlexaFluor 488 (Invitrogen, San Diego, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała kozie anty-królicze IgG, znakowane AlexaFluor 568 (Invitrogen, San Diego, Stany Zjednoczone).

3. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji DNA (Genomic Mini, A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska)
- Test TUNEL *(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end lab eling)* do oceny zmian apoptotycznych w komórkach (AAT Bioquest.Inc. Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Test ELISA do oznaczania ilościowego IL-33 i MMP-9 w surowicy, homogenatach tkanki żołądka kawii domowych oraz superntantach pohodowlanych (MyBiosource, San Diego, Stany Zjednoczone)
- Test ELISA do oceny antygenów *H. pylori* w próbkach kału (Immundiagnostik AG, Bensheim, Niemcy)
- Test ELISA do oznaczania ilościowego cytokin TNF-α, IL-1, IL-2, IL-12, (Elabscience, Houston, Stany Zjednoczone)
- Test ELISA pooznaczania ilościowego białka Hsp60 (Stressgen, Ann Arbour, MI, Stany Zjednoczone).
- Test do wykrywania antygenu Ki67 w tkance (Dako, Glostrup, Dania)
- Zestaw do barwienia preparatów histologicznych metodą srebrzenia (BioOptica, Mediolan, Włochy)
- Test LAL, do ilościowej oceny LPS (Lonza, Braine-Alleud, Belgia)
- Zestaw do oceny aktywności oksydazy (Microgen, Camberley, Wielka Brytania)
- Testy do oceny aktywności ureazy GOLD Hpdry (Lencom, Warszawa, Polska).

4. Sprzęt specjalistyczny

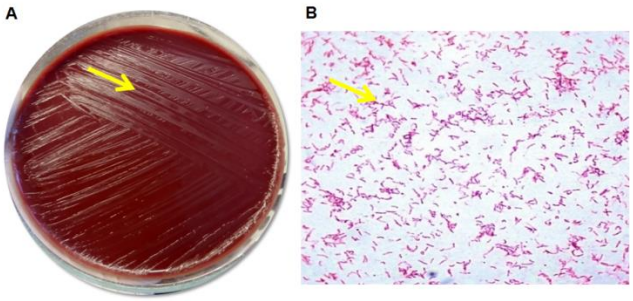
- Czytnik wielofunkcyjny Victor 2 (Wallac – 1420 Multilabel Counter, Oy, Turku Finlandia)
- Licznik scyntylacyjnego promieniowania β (MicroBeta 2 (Wallac, Oy, Turku, Finlandia).

- Mikroskop fluorescencyjny Axio Scope.A1 (Zeiss, Jena, Niemcy) z oprogramowaniem Zen2012 (Blue Edition) (Zeiss)
- Mikroskop konfokalny (Leica TCS SPE, Wetzlar, Niemcy)
- Mikroskop świetlny z odwróconym polem widzenia Olympus IX50 (Olympus, Tokio, Japonia)
- Mikrotom ACCU-CUT SRM 200 (Sakura, Kunshan, Chiny)

Metody

1. Hodowla *H. pylori* i orzymywanie ekstraktu glicynowego

Hodowlę szczepu referencyjnego *Helicobacter pylori* CCUG 17874 prowadzono na specjalistycznym podłożu agarowym (*Helicobacter* agar) w eksykatorze, w warunkach mikroaerofilnych, (10%CO_2, wilgotność 95%), w temperaturze 37°C, przez 5 dni. Następnie pałeczki *H. pylori* pasażowano 3 razy w powyższych warunkach celem usunięcia z hodowli form ziarniakowatych. Każdorazowo po uzyskaniu wzrostu sprawdzano wytwarzanie przez pałeczki *H. pylori* ureazy, oksydazy oraz katalazy, a także ich barwliwość w metodzie Grama. Wykazano, że stosując schemat hodowli: 5 dni, 3× pasaż co 48 godzin, usunięte zostają z hodowli formy ziarniakowate. Pozostają w hodowli formy wegetatywne o spiralnym kształcie, i barwiące się w metodzie Grama na różowo wytwarzające ureazę, katalazę i oksydazę **(Ryc. 1).**



Rycina 1. ***Reprezentatywny obraz pałeczek H. pylori w hodowli na podłożu agarowym oraz w mikroskopie świetlnym, po wybarwieniu metodą Grama. A*** *– Charakterystyczny wzrost na podłożu selektywnym, w warunkach mikroaerofilnych,* ***B*** *– reprezentatywny obraz pałeczek H. pylori barwionych metodą Grama w mikroskopie świetnym (YS100, Nikon, Japonia) (powiekszenie 1000* ***×,*** *imersja).*

Z hodowli *H. pylori* CCUG 17874 otrzymano kwaśny ekstrakt glicynowy, w skład którego wchodzą głównie białka powierzchniowe. Komponenty te, otrzymywano poprzez ekstrakcję kwaśnym buforem glicynowym 0,2 M, pH 2,2 wg metody Logana i Trusta *(Logan i Trust 1983).* Skład ekstraktu identyfikowano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz w teście Western blotingu z wykorzystaniem wzorcowych surowic pacjentów zakażonych *H. pylori (Logan i Trust 1983; Rechciński i wsp. 1997; Matusiak 2011).* Zawartość białka w EG wynosiła 600 µg/ml (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, ThermoScientific, Wlatman, WY, USA), natomiast stężenie LPS oznaczone w chromogennym teście LAL wynosiło 0,001 EU/ml. W EG wykazano białka o masach: 120 kDa (CagA), 87 kDa (VacA), 66 kDa (UreB), 60 kDa (Hsp), 29 kDa (UreA), w zakresie 66 -22 kDa.

2. Hodowle komórkowe – publikacje I-III, V

- Pierwotne komórki nabłonka żołądka wyprowadzono z tkanki żołądka kawii domowej wg wcześniej opisanej procedury *(Terano i wsp. 1982; Evans i wsp. 1992; Stern i wsp. 2012),* w modyfikacji własnej. Komórki hodowano w podłożu: DMEM i Ham's F-12 1:1, z dodatkiem 10% FCS, 1% HEPES, penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml), amfoterycyny B (0,025 µg/ml), L-glutaminy (2 mM/ml), naskórkowego czynnika wzrostu 01 µg/ml oraz 0,005 % roztworu dexametazonu w RPMI-1640, w warunkach inkubatora hodowlanego (37°C, 5%CO_2).

- Fibroblasty kawii domowej 104C1 (ATCC® CRL-1405™) hodowano w pełnym podłożu RPMI-1640 - cRPMI (*complete RPMI),* z czerwienią fenolową, zawierającym 10% termicznie inaktywowanej surowicy płodów cielęcych-FCS (*Fetal Calf Serum),* antybiotyki: penicylinę 100 U/ml i streptomycynę 100 µg/ml oraz L-glutaminę (2 mM/ml), w temperaturze 37°C, w warunkach inkubatora hodowlanego.

Szczegółowe warunki hodowli obu adherentnych linii komórkowych oraz sposób ich przygotowania do testów: gojenia rany (*scratch assay*), cytotoksyczności, proliferacji,

apoptozy, wytwarzania białek pro- lub przeciw-apoptotycznych oceny morfologii jąder komórkowych oraz wyciszana ekspresji genu IL-33, zostały opisane w **publikacji I, II i III.**

- Genetycznie modyfikowane monocyty ludzkie lini - THP1-Blue™ NF-κB (InvivoGen, San Diego, Stany Zjednoczone), hodowano w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie FCS, 50 U/ml penicyliny 100 µg/ml, normocyny i 200 µg/ml zeocyny. Hodowlę prowadzono w temp. 37°C, w warunkach inkubatora hodowlanego. Komórki pasażowano co 3, dni w warunkach jak wyżej **[publikacja V].**

Komórki THP1-X Blue™ użyto do oceny aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od czynnika transkrypcyjnego NF-κB oraz do oceny zewnątrzkomórkowego wydzielania cytokin TNF-α, IL -1, IL-2 i IL-12, w teście ELISA **[publikacja V]**.

2.1 Opracowanie modelu komórkowego z wyciszonym genem IL-33 – publikacja V

Fibroblasty oraz komórki pierwotne żołądka kawii domowej hodowano w studzienkach płytki 12-dołkowej i inkubowano przez noc celem utworzenia monolejeru (37^{o}C, 5% CO_2). Procedurę wyciszanie genu przeprowadzono z zastosowaniem siRNA IL-33, wg procedury producenta (SantaCruz Biotechnology, Stany Zjednoczone), **publikacja III.**

Efektywność transfekcji siRNA w komórkach obu linii komórkowych oceniono z zastosowaniem kontrolnego siRNA znakowanego FITC, na podstawie odsetka komórek fluoryzujących na zielono, obrazowanych w mikroskopie fluorescencyjnym **[publikacja III].**

Ponadto, przed i po wyciszeniu genu mierzono poziom wydzielanej prze komórki IL-33 w teście komercyjnym ELISA (My Biosouce), postępując wg procedury producenta. Komórki obu lini nietransfekowane lub transfekowane siRNA IL-33, nietraktowane lub traktowane EG, według procedur opisanych w **publikacji I i II** użyto do oceny migracji, proliferacji, redukcji MTT oraz apoptozy, którą oceniano

w teście TUNEL, w barwieniu DAPI, oraz na podstawie wytwarzania białka anty-apoptotycznego – Bcl-xL, pro-apoptotycznej kaspazy CC3. W komórkach nietransfekowanych lub transferowanych siRNA IL-33 oceniono także aktywację ścieżki sygnałowej Erk **[publikacjia III].**

3. Charakterystyka pacjentów i osób zdrowych [publikacja V]

Zakażenie *H. pylori* u pacjentów i zdrowych dawców oceniano za pomocą testu oddechowego ^{13}C UBT *(Bielański i Konturek 1996*), immunoblotingu dla przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* (Milenia®Blot *H. pylori,* DPC Biermann, GmbH, Niemcy) oraz z wykorzystaniem laboratoryjnego testu ELISA do oceny poziomu IgG przeciwko antygenom powierzchnowym *H. pylori* – EG. Ponadto w surowicach oceniano przeciwciała IgG anty-CagA, w teście ELISA z rekombinowanym białkiem CagA, według wcześniej opisanej procedury *(Rechcinski i wsp. 1997)* **[publikacja V]**. Poziom przeciwciał przeciwko białku Hsp60 oceniono w surowicach pacjentów z objawami dyspepsji i osób zdrowych oraz pacjentów z ChNS, w handlowym teście ELISA (czułość 3,125 ng/ml), potępując według procedury producena (Hsp60 ELISA, Stressgen, Ann Arbor, USA). Sposób przeprowadzenia testu i odczytu wyników opisano w **publikacji V.**

4. Charakterystyka modelu kawii domowej

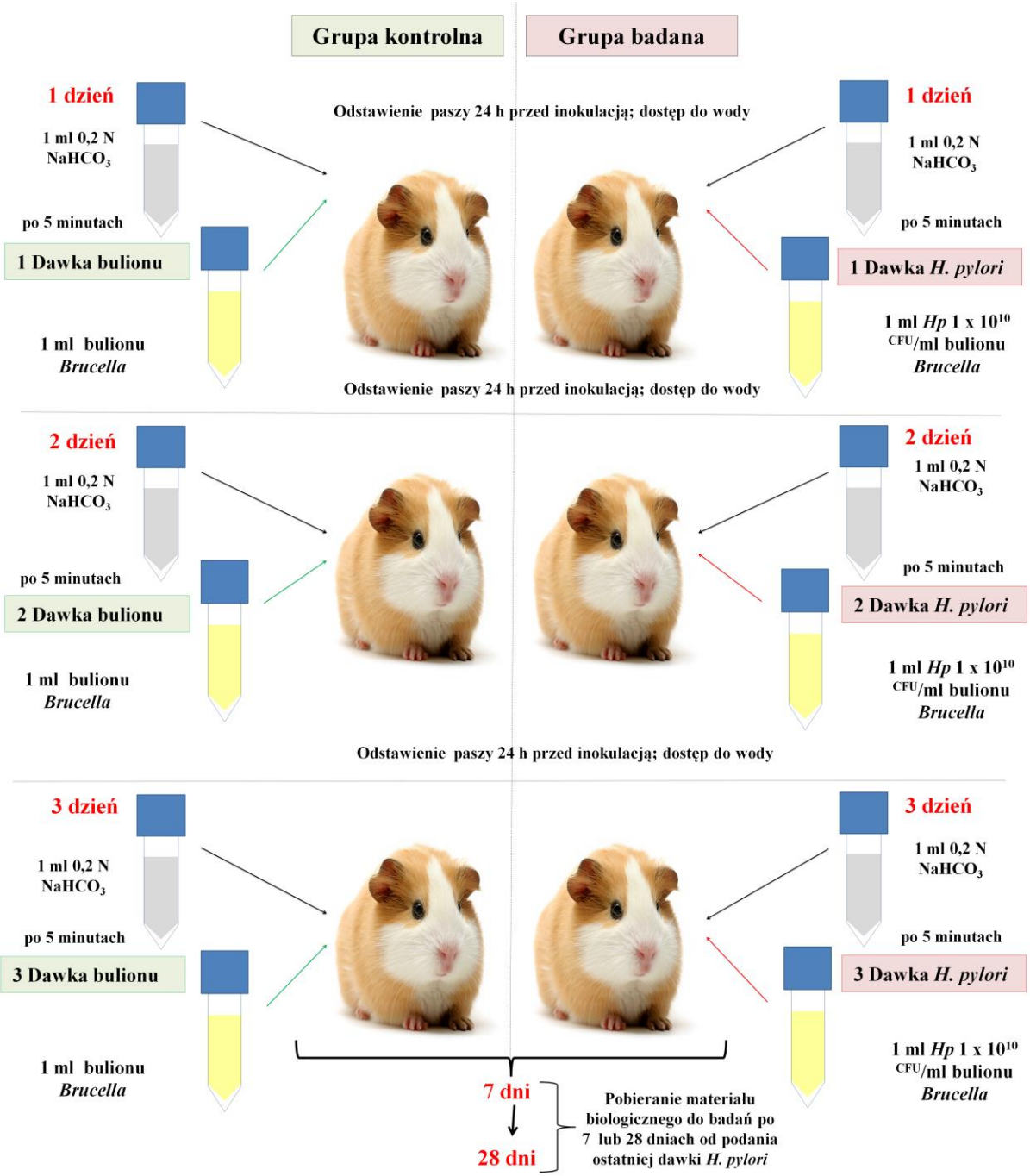
4.1 Wywołanie zakażenia *H. pylori* u kawii domowych [publikacja I, II,III, V]

Badania przeprowadzano na kawiach domowych, rasy himalajskiej z hodowli własnej Zwierzętarni Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Łącznie w badaniach użyto 90 zwierząt, w tym u 60 wywoływano zakażenie *H. pylori*, a 30 stanowiło grupę kontrolną. Zwierzętom obu grup, na 24 godziny przed rozpoczęciem procedury inokulacji, odstawiano paszę, zachowując ciągły dostep do wody pitnej.

- Zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały drogą pokarmową poprzez sondę 1 ml 0,2 N $NaHCO_3$, celem neutralizacji kwaśnego odczynu soku żołądkowego, a następnie po 5 minutach 1 ml podłoża *Brucella* z dodatkiem 10% surowicy. Procedurę powtarzano 3–krotnie, w odstępach dwudniowych.

- Zwierzęta inokulowane *H. pylori* otrzymywały drogą pokarmową 1 ml 0,2 N $NaHCO_3$, a następnie po 5 minutach 1 ml zawiesiny wzorcowego szczepu *H. pylori* w bulione *Brucella,* o gęstości 1×10^{10} CFU/ml. Procedurę inokulacji powtarzano 3 razy w odstępach dwudniowych.

Zwierzęta zakażone *H. pylori* po 7 lub 28 dniach od podania ostatniej dawki bakterii oraz zwierzęta grupy kontrolnej ważono, poddawano narkozie poprzez podanie dootrzewnowo barbituranu sodu, a następnie pobierano krew przez punkcję dosercową, celem otrzymania surowicy. Po pobraniu próbek krwi zwierzęta poddawano eutanazji przez przedawkowanie barbituranu sodu i izolowano żołądek do dalszych badań. Z indywidualnych klatek zbierano kał **[publikacje I, II, III, V]**. Sposób inokulacji zwierząt przedstawiono na **Rycine 2**.



Rycina 2. ***Procedura zakażania zwierząt pałeczkami H. pylori (Hp) i punkty kontrolne kolonizacji tymi bakteriami*** *(7 i 28 dni od ostatniej inokulacji).*

4.2 Potwierdzenie zakażenia *H. pylori* u kawii domowych

Do metod diagnostycznych stosowanych rutynowo do identyfikacji zakżeń *H. pylori* u ludzi, które zostały określone, jako „złoty standard" diagnostyczny przez European Consensus Group w 1997 r. w Maastricht, zmodyfikowany w 2002 r. należą urazowy test oddechowy (^{13}C UBT) oraz badanie histopatologiczne wycinków błony śluzowej żołądka *(Malfertheiner i wsp. 2002),* w kierunku stwierdzenia charakterystycznych zakrzywionych bakterii oraz oceny nasilenia i charakteru reakcji zapalnej.
Do oceny zakażenia *H. pylori* u kawii domowych inokulowanych tymi bakteriami wykorzystano wybrane testy stosowane do identyfikacji takich zakażeń u ludzi: testy serologiczne oraz badania histopatologiczne **[publikacje I, II, III, V]**.

- Metody serologiczne

Do potwierdzania zakżenia wykorzystano próbki kału, w których oznaczano antygeny *H. pylori* stosując handlowy test immunoenzymatyczny ELISA, zgodnie z procedurą producenta. W surowicy krwi oznaczano poziom surowiczych przeciwciał klasy IgM i IgG przeciwko antygenom *H. pylori,* metodą ELISA. W badaniach wykorzystano wcześniej opracowany test ELISA z wykorzystaniem EG wzorcowego szczepu *H. pylori* CCUG 17874 *(Rechciński i wsp. 1997)* **[publikacja I, II, III, V].** Za wynik dodatni testu na obecność antygenów *H. pylori* w kale zwierząt przyjmowano wartość absorbancji powyżej wartości granicznej $OD_{\lambda 450}$ = 0,150. Natomiast za wynik dodatni w teście ELISA na obecność surowiczych przeciwciał anty-*H. pylori* przyjmowano wartości absorbancji wyznaczone doświadczalne powyżej $OD_{\lambda 450}$=0,26 oraz $OD_{\lambda 450}$ = 0,05, odpowiednio dla przeciwciał klasy IgM i przeciwciał klasy IgG.

- Metody molekularne

Tkankę żołądka z części *antrum* pobraną od zwierząt inokulownych *H. pylori* oraz kontrolnych, wykorzystano do reakcji PCR celem wykrycia sekwencji *ureC* i *cagA* kodujących, odpowiedno białko CagA i podjednostkę UreC ureazy *H. pylori* **[publikacja II].**

- Startery dla sekwencji kodującej gen *ureC* (wielkość produktu amplifikacji 294pz)

1 D008 (5'-ATAATGCTAAATTAGACAACTTGAGCGA-3')

2 R008 (5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACTCCAT-3')

- Startery dla sekwencji kodującej gen *cagA* (wielkość produktu amplifikacji 298pz)

1 UC1 (5'-AAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3')

2 UC2 (5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3')

Tabela 2. Warunki reakcji amplifikacji genu *cagA i ureC*

Wstępna denaturacja	5 min w 94°C	1 cykl
Denaturacja	1 min w 94°C	38 cykli
Przyłączenie starterów *cagA* *ureC*	 1 min w 60°C 1 min w 55°C	
Wydłużanie	1 min w 72°C	
Denaturacja	1 min w 94°C	1 cykl
Przyłączenie starterów	1 min w 60°C	
Wydłużanie końcowe	5min w 72°C	

- Metody histopatoloigiczne

W tkance żołądka kawii domowych identyfikowano organizmy *Helicobacter*-podobne (HLO), w preparatch cieńkowarstwowych barwionych barwnikiem Giemsy lub wysrebrzanych wg metody Warthina-Starry'ego **[publikacja I, II, III, V].** Ocenę HLO wykonono we współpracy z dr Pawłem Stawerskim (Zakład Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) oraz lek. med. Aliną Knapik-Dąbrowicz (Zakład Patomorfologii, Szpital im. K. Bieganskiego, Łódź), specjalistami w zakresie histopatologii. Do oceny organizmów HLO w tkance żołądka zastosowano 4 stopniową skalę:

- 0 – brak bakterii w kryptach tkanki żołądka,
- 1– łagodny stopień kolonizacji, bakterie obecne w niektórych kryptach,
- 2 – umiarkowany stopień kolonizacji, bakterie wykryte w większości krypt,
- 3 – wysoki stopień kolonizacji, bakterie obecne we wszystkich kryptach błony śluzowej żołądka *(Stole i Meining, 2001)* **[publikacja I, II, III, V].**

Ponadto w preparatach cieńkowarstwowych z tkanki żołądka identyfikowano *H. pylori* w barwieniu immunohistochemicznym z zastosowaniem specyficznych przeciwciał króliczych anty-*H. pylori* znakowanych fluorescencyjnie izotiocjaninem fluoresceiny (FITC). Bakterie oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axio Scope.A1) **[publikacja III].**

Szczegółowy opis metod i sposób analizy otrzymanych wyników oraz testów do identyfikacji zakażenia *H. pylori* na modelu kawii domowych przedstawiono w **publikacji I, II, III i V.**

4.3 Wyznaczniki miejscowej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka kawii domowych publikacja I, II,

- Infiltracja komórek immunokompetenych

Stan zapalny w nabłonku żołądka zwierząt oceniono w prepratach cienkowarstwowych z tkanki żołądka barwionych hematoksyliną-eozyną. Oceniono stopień infiltracji granulocytów (aktywny stan zapalny) i limfocytów (reakcja zapalna przewlekła), według skali opartej na elementach Systemu Sydney (ujednolicona procedura oceny zmian histopatologicznych w nabłonku żołądka u ludzi):

- 0 – brak komórek zapalnych,
- 1 – łagodny stan zapalny, do 40 komórek zapanych,
- 2 – umiarkowany stan zapalny, powyżej 60 komórek zapalnych,
- 3 – silny stan zapalny , powyżej 80 komórek zapalnych *(Stole i Meining, 2001).*

Obrazowanie wykonano w mikroskopie świetnym (YS100, Nikon, Japonia).

Stan zapalny oceniono we współpracy z dr Pawłem Stawerskim (Zakład Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) oraz lek. med. Aliną Knapik-Dąbrowicz (Zakład Patomorfologii, Szpital im. K. Bieganskiego, Łódź), specjalistami w zakresie histopatologii **[publikacja I, II].**

Neutrofile oraz limfocyty TCD4+ i TCD8+, w tkance żołądka kawii domowych, identyfikowano w barwieniu immunohistochemicznym z zastosowaniem przeciwciał anty-1A8-Ly-6G (identyfikacja granulocytów) lub anty- TCD4+ i TCD8+ (identyfikacja

limfocytów T o fenotypie TCD4 lub TCD8), skoniugowanych z FITC. Obrazowanie wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axio Scope.A1) **[publikacja II].**

- Proliferacja komórek nabłonkowych w tkance żołądka, na podstawie antygenu Ki-67 – **publikacja II**

Proliferujące komórki nabłonkowe żołądka kawii domowych oceniono w barwieniu imunohistochemicznym preparatów cienkowarstwowych tkanki żołądka, z zastosowaniem przeciwciał przeciwko antygenowi Ki-67 cyklu komórkowego, znakowanych peroksydazą chrzanową (Sigma, St. Luise, Stany Zjednoczone). Tkanki oceniono w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 40×. Z każdego preparatu wykonano 5 zdjęć z losowo wybranych pól, a wyniki przedstawiono jako wskaźnik proliferacji (LI%) wyrażający odsetek komórek znakowanych antygenem Ki-67 (komórki wybarwione na brązowo). Procedurę obróbki tkanki, sposób barwienia, przeprowadzenia analizy zostały opisane w **publikacji II.**

5. Ocena roli MUC5AC oraz determinantów LewisX i LewisY w adhezji *H. pylori* do komórek nabłonkowych żołądka– publikacja I

Podczas zakażenia *H. pylori* dochodzi do interakcji tych bakterii z komórkami nabłonka żołądka gospodarza, co skutkuje trwałą kolonizacją, pomimo wielu mechanizmów ochronnych tej bariery. Początkowe oddziaływania obejmują wiązanie składników śluzu, głównie MUC5AC. Taka właściwość jest determinowana przez komponenty powierzchniowe *H. pylori* m.in. białko BabA. Ponieważ zakażenie z czasem ulega utrwaleniu można sądzić, iż bakterie posiadają mechanizmy przystosowawcze do utrzymania się w organizmie gospodarza. W pracy badano efektywność adhezji *H. pylori* do komórek nabłonkowych żołądka kawii domowych w modelu *in vivo* w zależności od czasu trwania zakażenia oraz *in vitro* po ekspozycji takich komórek na bakteryjne antygeny i ich rozpuszczalne komponenty. Proces adhezji *H. pylori* badano w kontekście nasilenia wytwarzania przez komórki nabłonkowe żołdaka MUC5AC oraz determinantów LewisX (LeX) i LewisY (LeY).

Pierwotne komórki nabłonkowe żołądka kawii traktowane lub nietraktowane antygenami *H. pylori*, lub żywymi pałeczkami *H. pylori,* wg wcześniej opisanej procedury, a także preparaty cienkowarstwowe pochodzące z tkanki żołądka zwierząt zakażonych *H. pylori* lub kontrolnych, wybarwiano pierwszorzędowymi mysimi przeciwciałami anty-MUC5AC lub anty-LeX/LeY a następnie drugorzędowymi przeciwciałami skoniugowanymi z FITC. Komórki z hodowli *in vitro* były dalej wybarwiane barwnikiem Texas-Red/falloidyna celem uwidocznienia cytoszkieletu oraz barwinkiem DAPI dla uwidocznienia jąder komórkowych. Obrazowanie prowadzono w mikroskopie konfokalnym (Lecica SPE), przy odpowiednich długościach fali: dla FITC wzbudznie 495 nm, 519 nm emisja, dla falloidyny 591 nm wzbudzenie i 608 nm emisja, a dla DAPI 358 nm wzbudzenie i 461 nm emisja Zarówno procedura bawienia tkanki żołądka, jak i warunki stymulacji komórek w hodowlach *in vitro*, a także sposób oceny wytwarzania MUC5AC oraz determinantów LeX i Le Y zostały szczegółowo opisane w **publikacji I.**

W celu oceny nasilenia adhezji *H. pylori* do komórek pierwotnych nabłonka żołądka, do hodowli komórek linii pierwotnej, nietraktowanych lub traktowanych antygenami *H. pylori,* dodawano żywe pałeczki *H. pylori* wg wcześniej opisanej procedury. Następnie wybarwiano je przeciwciałami anty-*H. pylori* znakowanymi FITC. Obrazowanie prowadzono w mikroskopie konfokalnym, przy długościach fali dla FITC: wzbudznie 495 nm, 519 nm emisja (Lecica SPE) **[publikacja I]**.

Celem potwierdzenia/wykluczenia zależności pomiędzy nasileniem wytwarzania prez komórki nabłonkowe MUC5AC i determinantów LeX/LeY a zwiększoną efektywnością wiązania tych bakterii w środowisku komponentów *H. pylori,* pierwotne komórki nabłonka żołądka kawii oraz preparaty cienkowarstwowe tkanek żołądka zwierząt traktowano przeciwciałami blokującymi anty-MUC5AC lub anty-LeX/LeY, a następnie inkubowano z żywymi pałeczkami *H. pylori,* które wybarwiano przeciwciałami anty-*H. pylori* znakowanymi FITC **[publikacja I]**. W podjętych eksperymentach sprawdzano także, czy determinanty LeX, LeY występujące w LPS *H. pylori* również determinują przyleganie tych baterii do komórek nabłonkowych żołądka. W tym celu żywe pałeczki *H. pylori,* nietraktowane lub traktowane przeciwciałami anty-LeX, anty-LeY lub anty-LeX/LeY, dodawano do hodowli

pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka kawii domowych, jak opisano wcześniej i wybarwiono przeciwciałami anty-*H. pylori* znakowanymi FITC. Intensywność fluorescencji oceniano w wielofunkcyjnym czytniku Victor 2 **[publikacja I]**.

6. Komórkowe i tkankowe wyznaczniki stresu oksydacyjnego – publikacja II, III

Podczas zakażenia *H. pylori* przewlekły stan zapalny jest związany z ciągłą infiltracją komórek immunokompetentnych, ich aktywację i degranulację, co może być przyczyną nasilenia stresu oksydacyjnego. Utrzymująca się reakcja zapalna skutkuje uszkodzeniem bariery nabłonkowej żołądka. Szczególnie napływ i aktywacja neutrofilów skutuje wydzielniem MPO, która wykazuje silne właściwości bakteriobójcze i pośredniczy w reakcjach utlenienia i redukcji (redox). O natężeniu stresu oksydacyjnego świadczyć może także wzrost produktu peroksydacji lipidów, jakim jest 4HNE. W pracy, w homogenatach tkanki żołądka kawii niezakażonych lub inokulowanych *H. pylori* ocaniano ilościowo MPO, a żołądka także 4HNE. Wytwarzanie MPO i 4HNE oznaczano również w hodowlach pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów kawii domowych traktowanych komponentami *H. pylori.* Ponadto w bdaniach użyto także tranfekowane lub nietranfekowane siRNA IL-33 komórki kontrolne lub hodowane w śrdowowisku EG *H. pylori* **[publikacja II, III].**

- Ocena produktu peroksydacji lipidów- 4HNE

Komórki linii pierwotnej, traktowane lub nietraktowane komponentami *H. pylori,* a także transfekowane lub nietransfekowane siRNA IL-33 wg wcześniej opisanej proceduty, jak również preparaty cienkowarstwowe pochodzące z tkanki żołądka zwierząt zakażonych *H. pylori* lub kontrolnych, barwiono pierwszorzędowymi przecwciałmi anty-4HNE, a następnie drugorzędowymi przeciwciałami znkowanymi FITC. Jądra komórkowe wybarwiono kontrastowym barwnikiem fluorescencyjnym DAPI. Preparaty cienkowarstwowe obrazowano na obecność 4HNE w mikroskopie fluorescencyjnym (Axio Scope.A1), natomiast intensywność wytwarzania 4HNE

w tkance żołądka oceniono w programie ImageJ *(Jensen 2013).* Pierwotne komórki nabłonka żołądka lub fibroblasty obrazowano w mikroskopie konfokalnym (Lecica SPE), natomiast intensywność fluorescencji komórek mierzono w wielofunkcyjnym czytniku Victor 2, przy długości fali dla FITC (wzbudzenie 495 nm, emisja 519 nn).

Warunki stymulacji komórek w hodowlach *in vitro*, sposób obrazowania i warunki oceny fluorescencji opisano w **publikacji II, III.**

- Ocena stężenia mieloperoksydazy (MPO) w tkance żołądka

Do oceny MPO w tkance żołądka kawii domowych zastosowano metodę kolorymetryczną z chromogenem TMB, w środowisku 30%H_2O_2. Procedurę przygotowania tkanki oraz ilościową ocenę MPO opisano szczegółowo w **publikacji II.** Absorbancję będącą podstawą oceny MPO mierzono w czytniku Victor 2, przy długości fali 450 nm.

7. Aktywacja kinazy Erk – publikacja III

Użyto pierwotne komórki nabłonka żoładka lub fibroblasty kawii domowej zdolne do wytwarzania IL-33 lub niezdolne wskutek transfekcji siRNA IL-33, traktowane EG *H. pylori* lub hodowane w samym podłożu. Komórki wybarwiano przeciwciałami pierwszorzędowymi anty-p44/42 MAPK przeciw ufosforylowanej kinazie Erk *(extracellular signal–regulated kinases)* i drugorzędowymi przecwciałmi znakowanymi FITC. Warunki stymulacji komórek w hodowlach *in vitro,* sposób przeprowadzenia badania oraz odczytu fluorescencji opisano w **publikacji III.**

8. Apoptoza – publikacja II i III

Pałeczki *H. pylori* wykształciły mechanizmy zaburzające strukturę komórkową bariery nabłonkowej żołądka. Jedną z przypuszczalnych przyczyn zaburzenia integralności tej bariery może być obumieranie komórek na drodze apoptozy. Komórki ulegajace apoptozie oceniano w tkance żoładka zwierząt niezakażonych lub zakażonych *H. pylori* a także w hodowlach pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów kawi domowych. Użytko komórki eksponowane na komponenty *H. pylori,* a także komórki transfekowane lub nietransfekowane siRNA

IL-33 traktowane lub nietraktowane EG *H. pylori*. Apoptozę oceniono w tescie TUNEL i/lub na podstawie wytwarzania białek pro- (CC3, Bax) lub anty-apoptotycznych (Bcl-2, Bxl-xL), a także w barwieniu jąder komorkowych barwnikiem DAPI **[pubikacja II i III].**

- **Test TUNEL**

Użyto fluorescencyjny test TUNEL *(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling),* umożliwiający wykrywanie podwójnych pęknięć w DNA (AAT Bioquest.Inc. Stany Zjednoczone). Jądra komórkowe dobarwiano fluorescencyjnym barwnikiem Hoechst. Komórki ulegające apoptozie analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axio Scope.A1) lub konfokalnym (Leica SPE), przy długości fali 550/590 nm, natomiast intensywność świecenia oceniono z wykorzystaniem programu ImageJ *(Jensen 2013).* Warunki stymulacji komórek w hodowlach *in vitro*, sposób przeprowadzenia badania oraz obrazowania komórek i tkanek żołądka kawii domowych w mkroskoie fluorescencyjnym opisano szczegółowo w **publikacji II i III.**

- **Identyfikacja białek pro- (CC3 i Bax) oraz anty-apoptotycznych (Bcl-xL i Bcl-2)**

Preparaty cienkowarstwowe tkanki żołądka kawii domowych barwiono immunohistochemicznie z zastosowaniem przeciwciał anty-CC3 lub anty-Bcl-xL, a następnie drugorzędowych przeciwciał znakowanych AlexaFluor 568. Tkanki obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axio Scope.A1), lub konfokalnym (Leica SPE), przy długości fali 550/590 nm, Odsetek komórek apoptotycznych obliczano stosując progam ImageJ *(Jensen 2013)* **[publikacja II, III].**

W hodowlach komórkowych *in vitro,* pierwotne komórki nabłonkowe żołądka, a także fibroblasty kawii domowej, stymulowano komponentami *H. pylori,* w środowisku lub bez egzogennej MMP-9 (BioVision Incorporated, Milpitas, Stany Zjednoczone) wg wcześniej opisanej procedury. Następnie komórki wybarwiono z zastosowaniem przeciwciał: anty-Bax, anty-CC3, anty-Bcl-xL, anty-Bcl-2, a następnie drugorzędowych przeciwciał znakowanych FITC. Jądra komórkowe dobarwiono DAPI. Komórki obrazowano w mikroskopie konfokalnym (Leica SPE), przy długości

fali dla FITC 550/590 nm, lub dla DAPI 358/461 nm. Intensywność fluorescencji mierzono w wielofunkcyjnym czytniku Victor2 **[publikacja II].** Szczegółowy sposób przeprowadzenia badania i obrazowania komórek w mkroskopie fluorescencyjnym lub konfokalnym opisano w **publikacji II.**

9. Ocena naturalnej i indukowanej komponentami *H. pylori* aktywności metabolicznej oraz migracji i proliferacji komórek – publikacja II i III

Zdolność migracji i proliferacji komórek umożliwiają regenerację uszkodzonej tkanki, a ich efektywność jest związana m.in. z aktywnością metaboliczną komórek będącą wyznacznikiem żywotności. W badaniach oceniono aktywność metaboliczną komórek na podsawie redukcji MTT, zdolość do migracji w teście gojenia rany, a proliferację na podstwanie wbudowywania do DNA dzielących się komórek tymidyny znakowanej trytem ([^{3}H] TdR) **[publikacja II i III].**

- Aktywność metaboliczna komórek

W celu ilościowej oceny działania cytotoksycznego komponentów *H. pylori* wobec pierwotnych komórek nabłonka żołądka lub fibroblastów kawii domowej, transfekowanych lub nietransfekowanych siRNA IL-33, posłużono się metodą opartą na ocenie aktywności oksydoredukcyjnej mitochondrialnej dehydrogenazy w tzw. teście redukcji soli tetrazolowej MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Dehydrogenaza mitochondrialna jest aktywna wyłącznie w żywych komórkach redukuje rozpuszczalną w wodzie sól MTT do nierozpuszczalnych w wodzie barwnych kryształów formazanu. Intensywność barwy roztworu po rozpuszczeniu złogów formazanu jest wyznacznikiem aktywności metabolicznej komórek i ich żywotności.
Warunki stymulacji pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów komponentami *H. pylori*, w hodowlach *in vitro,* sposób przeprowadzenia testu i odczytu spektrofotometrycznego opisano w **publikacji II i III.** Na podstawie uzyskanych wyników wyliczano odsetek komórek zdolnych lub niezdolnych do redukcji MTT, w odniesieniu do aktywności komórek hodowanych w samym podłożu.

Przyjęto, że średnia absorbancja uzyskana dla komórek niestymulowanych oznacza 100% żywych komórek aktywnych metabolicznie.

- Test gojenia rany (*scratch assay/wound healing assay*)

Oceniano zdolność zabliźniania uszkodzonej monowarstwy pierwotnych komórek nabłonka żołądka lub fibroblastów kawii domowych, nietraktowanych lub traktowanych komponentami *H. pylori*, a także transfekowanych lub nietransfekowanych siRNA IL-33. Wyznacznikiem zdolności komorek do regeneracji była migracja komórek w tzw. teście gojenia rany. Zawiesiny komórek inkubowano przez 18 godzin (37^{o}C, 5% CO_2), celem uzyskania 100% konfluencji. Następnie jałową końcówką do pipety automatycznej (p200) mechanicznie uszkadzano monowarstwę komórkową, wykonując rysę. Komórki przepłukiwano samym podłożem i nanoszono podłoże hodowlane z 2% dodatkiem surowicy, aby zminimalizować proliferację komórek i nie dopuścić do ich odklejenia lub apoptozy. Zdolnosć migracji - gojenia rany przez komórki wyrażano jako odsetek komórek migrujących do strefy uszkodzenia, po ekspozycji na komponenty *H. pylori,* w odniesieniu do odsetka komórek kontrolnych przemieszczających się do tej strefy. Komórki obserwowano w mikroskopie świetlnym (YS60, Nikon). Warunki stymulacji komórek w hodowlach *in vitro*, sposób przeprowadzenia badania i odczytu wyników zostały szczegółowo opisane w **publikacji II i III.**

- Oznaczanie proliferacji komórek z zastosowaniem tymidyny znakowanej trytem ([^{3}H] TdR)

Radioaktywny test proliferacji komórkowej oparty na pomiarze efektywności wbudowywania tymidyny znakowanej trytem ([^{3}H] TdR) podczas syntezy DNA, posłużył do ilościowej oceny wzrostu komórek hodowanych uprzednio w środowisku komponentów *H. pylori* lub w samym podłożu hodowlanym (proliferacja spontaniczna). Pierwotne komórki nabłonka żołądka lub fibroblasty kawii domowych transfekowane lub nietransfekowane siRNA IL-33 stymulowano komponentami *H. pylori* Warunki stymulacji opisano w **publikacji II i III.** Hodowle komórek prowadzono przez 72 godziny. Izotop dodawano do hodowli komórek 18 godzin przed jej zakończeniem. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym

promieniowania β (Wallac, Oy, Turku, Finlandia). Wyniki przedstawiono w formie indeksu stymulacji, stanowiącego iloraz z liczby impulsów dla komórek stymulowanych przez liczbę impulsów dla komórek niestymulowanych **[publikacja II i III].**

10. Ocena nasilenia wytwarzania rozpuszczalnych mediatorów prozapalnych – publikacja II i III

Podczas zakażenia *H. pylori* reakcja zapalna rozwija się miejscowo (tkanka żołądka) ale także na obwodzie, co pozwala sugerować ogólnoustrojowe efekty zakażenia. W pracy oznaczano wydzielanie następujących mediatorów prozapalnych - MMP-9 w homogenatach tkankowych a także w surowicy zwierząt niezakażonych lub inokulowanych *H. pylori* oraz w supernatantach pohodowlanych, po stymulacj pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka kawii domowych lub fibroblastów antygenami *H. pylori,* wg wcześniej opisanej procedury. Zastosowano handlowy test ELISA wg procedury producenta (czułość 1.0 pg/ml) (MyBiosource, Stany Zjednoczone) **[publikacja II i III].** W surowicach zwierząt nieinokulowanych lub inokulowanych *H. pylori* oznaczano TNF-α stosując handlowy test ELISA (czułość 3.13 pg/ml), wg procedury producenta (ThermoScientific, Stany Zjednoczone) **[publikacja II].** Poziom cytokin: TNF-α, IL-1, IL-2, IL-12 oznaczano także w supernatantach z hodowli monocytów THP1xBlue™, traktowanych peptydem P1, zawierającym sekwencję wspólną dla ludzkiego białka Hsp60 i HspB *H. pylori.* Zastosowano handlowe testy ELISA, według procedury producena (Elabscience, Stany Zjednoczone).

Wydzielnie IL-33 oceniano miejscowo – w preparatach cienkowarstwowych tkanki żoładka kawii niezakażonych lub inokulowanych *H. pylori,* w barwieniu immunohistochemicznym z zastosowaniem przeciwciał anty-IL-33 oraz przeciwciał drugorzędowych znakowanych FITC (ThermoScientific, Stany Zjednoczone). Obrazowanie przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym (Axio Scope.A1), natomiast intensywność świecenia określono z wykorzystaniem programu ImageJ *(Jensen 2013).* IL-33 oceniono także w homogenatach tkanki żołądka zwierząt oraz w surowicy, a także w supernatantach z hodowli pierwonyh komórek nabłonka

żołądka lub fibroblastów kawii domowej symulowanych EG, stosując komercyjny test ELISA, zgodnie z procedurą producenta (czułość 1.0 pg/ml) (MyBiosource, Stany Zjednoczone). Ponadto komórki obu typów barwiono z zastosowaniem przeciwciał anty-IL-33 oraz drugorzędowych przeciwciał znakowanych FITC. Obrazowanie wykonano w mikroskopie konfokalnym (Leica SPE), natomiast intensywność świecenia określono z wykorzystaniem programu ImageJ *(Jensen 2013)* **[publikacja III].**

11. Wykrywanie surowiczych przeciwciał anty-Hsp60/HspB indukowanych podczas zakażenia *H. pylori* [publikacja V].

Występowanie mimikry antygenowej pomiędzy komponentami gospodarza i *H. pylori* pozwala sugerować, że podczas zakażenia *H. pylori* mogą być produkowane przeciwciała potencjalnie krzyżowo-regujące. Przeciwciała takie wiążąc się z komponentami gospodarza w tkankach mogą przyczyniać się do nasilenia reakcji zapalnej wskutek aktywacji dopełeniacza. Krzyżowe wiązanie ludzkiego białka Hsp60 przez przeciwciała inicjowane przez czynniki zakaźne jest jednym z najczęściej proponowanych mechanizmów łączących choroby zakaźne z rozwojem choroby niedokrwiennej serca. W pracy wzięto pod uwagę autoimmunizacyjne podłoże zależności pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a rozwojem choroby niedokrwiennej serca, które może wynikać z podobieństwa między ludzkim białkiem Hsp60 i HspB *H. pylori*. Wykonao analizę bionformatyczną w celu potwierdzenia/wykluczenia występowania podobieństwa sekwencji aminokwasowych w obu białkach za pomocą narzędzia Basic Local Alignment Search Toll (BLAST) z bazy danych National Center Biotechnology Information. Pozyskano (komercyjna synteza) peptyd: P1- zawierający sekwencję aminokwasów ATVLA, występujący w białku HspB *H. pylori* (numer białka GenBank: AAL86900.1) tożsamy z sekwencją białka ludzkiego Hsp60 oraz kontrolny peptyd P2 bez wspólnej sekwencji. W pracy oceniono poziom przeciwciał IgG przeciwko białku rekombinowanemu Hsp60 w surowicach zdrowych dawców oraz pacjentów z ChNS, w komercyjnym teście ELISA, czułość 2,88 ng/ml (Stressgen, Ann Arbour, MI, Stany Zjednoczone). Następnie w surowicach ludzkich pochodzących od osób zdrowych, z wykluczonym zakażeniem *H. pylori* lub zakażeniem bezobjawowym oraz w surowicach pacjentów z ChNS, oceniono poziom przeciwciał IgG przeciwko

białkom P1 lub P2, w laboratoryjnym teście ELISA, opisanym w **publikacji V.** Poziom IgG anty-P1 lub P2 oceniano także w surowicach zwierząt nie inokulowanych lub inokulowanych pałeczkami *H. pylori*. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm w wielofunkcyjnym czytniku Victor 2 (Wallac). Watrośc odcięcia *(cut off)* $OD_{\lambda 450}$=0,3 stanowiła 2-krotną wartość absorbancji dla studzienek kontrolnych, które zostały opłaszczone peptydami i inkubowane z przeciwciałami znakowanymi peroksydazą chrzanową, powiększoną o odchylenie standardowe. Aby wykazać, że przeciwciała krzyżowo-reagujące mogą być indukowane przez *H. pylori* surowice absorbowano dwukrotnie zabitymi termicznie pałeczkami *H. pylori* CCUG 17874 *(Matusiak i wsp. 2016)* i przed i po absorpcji oznaczono w nich IgG anty-P1 lub anty-P2 jak poprzednio. Sposób przeprowadzenia testu i odczytu wyników zamieszczono w **publikacji V.**

12. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników zastosowano program STATISTICA PL 12. Oznaczano następujące parametry statystyczne:

- mediana

$$m_e = [\frac{X_{\frac{n}{2}} + X_{\frac{n}{2}}}{2} + 1]$$

gdzie:

n - liczba

- średnia arytmetyczna

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_1}{n}$$

gdzie:

x_1 - wartość pojedynczej próby

n - liczba prób

- odchylenie standardowe – SD (*standard deviation*)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

gdzie:

x_1 - wartość pojedynczej próby

$\bar{x}$ - wartość średniej arytmetycznej

n - liczba prób

- nieparametryczny test U Mann-Whitney, który nie wymaga równoliczności grup, rozkładu normalnego, użyto aby porównać ze sobą dwie niezależne wobec siebie grupy

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

gdzie:

n_1 - liczba prób dla grupy pierwszej

n_2 - liczba prób dla grupy drugiej

R_1 - suma rang wartości

- nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, który nie wymaga równoliczności grup, nie spełniających warunku rozkładu Gausa rozkładu, użyto aby porównać ze sobą trzy lub więcej niezależnych wobec siebie grup

$$T = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^{k} \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

gdzie:

n_i - liczba prób dla grupy

n - liczebność dla grupy

R_i - suma rang wartości

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD lub jako medianę ± rangę (w zależności od użytego testu statystycznego). Za istotne statystycznie przyjęto różnice z wartością współczynnika $p \leq 0{,}05$.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej

Gonciarz et al. Journal of Biomedical Science (2019) 26:23
https://doi.org/10.1186/s12929-019-0515-z

MOST 科技部 Ministry of Science and Technology
The cost of publication in Journal of Biomedical Science is borne by the Ministry of Science and Technology, Taiwan.

Journal of Biomedical Science

RESEARCH Open Access

Upregulation of MUC5AC production and deposition of LEWIS determinants by *HELICOBACTER PYLORI* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection

Weronika Gonciarz[1], Maria Walencka[1], Anthony P. Moran[2^], Krzysztof Hinc[3], Michał Obuchowski[3] and Magdalena Chmiela[1*]

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* bacteria colonize human gastric mucosa, cause chronic inflammation, peptic ulcers and gastric cancer. Colonization is mediated by *H. pylori* adhesins, which preferentially bind mucin 5 (MUC5AC) and Lewis (Le) determinants. The aim of this study was to evaluate the influence of *H. pylori* and their components on MUC5AC production and deposition of LeX/LeY in gastric epithelial cells in relation to bacterial adhesion using *Caviae porcellus* primary gastric epithelial cells and an in vivo model of experimental *H. pylori* infection in these animals.

Methods: MUCA5C and LeX/LeY were induced in vitro by live *H. pylori* reference strain CCUG 17874 (2×10^7 CFU/ml), *H. pylori* glycine acid extract (GE), 10 μg/ml; cytotoxin associated gene A (CagA) protein, 1 μl/ml; UreA urease subunit, 5 μg/ml; lipopolysaccharide (LPS) 25 ng/ml and imaged by fluorescence microscopy after anti-MUC5AC or anti-LeX/LeY FITC antibody staining. Bacterial adhesion was imaged by using anti-*H. pylori* FITC antibodies. The animals were inoculated per os with *H. pylori* (3 times in 2 days intervals, 1×10^{10} CFU/ml). After 7 or 28 days an infection and inflammation were assessed by histological, serological and molecular methods. Gastric tissue sections of infected and control animals were screend for MUCA5C and LeX, and *H. pylori* adhesion as above.

Results: MUC5AC production and deposition of Lewis determinants, especially LeX were upregulated in the milieu of live *H. pylori* as well as GE, CagA, UreA or LPS in vitro and in vivo during infection, more effectively in the acute (7 days) than in the chronic (28 days) phase of infection. This was related to enhanced adhesion of *H. pylori*, which was abrogated by anti-MUC5AC and anti-LeX or anti-LeY antibody treatment.

Conclusions: Modulation of MUCA5C production and LeX/LeY deposition in the gastric mucosa by *H. pylori* can significantly increase gastric tissue colonization during *H. pylori* infection.

Keywords: MUC5AC, LewisX/Y, *H. pylori*, Guinea pigs

* Correspondence: chmiela@biol.uni.lodz.pl
^Deceased
[1]Division of Gastroimmunology, Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Poland
Full list of author information is available at the end of the article

BMC

© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Introduction

The gastric mucosa is a physical barrier covered with a mucus layer, which protects stomach against harmful chemical, enzymatic, microbiological and mechanical factors [1, 2]. The integrity of gastric epithelial cells is maintained by tight junctions whereas cell proliferation promotes a renewal of this layer. Also the outer leyer of gastric mucosa loosely adheres to epithelium and is constantly removed and renewed, which protects a movement of pathogens to the stomach basement membrane [3, 4]. However, *Helicobacter pylori* Gram-negative microaerophilic rods, discovered by Warren and Marshall in 1983, are able to penetrate through gastric mucosa due to their spiral shape and flagella [5–8]. *H. pylori* can change the structure of mucus by thioredoxin, which reduces the disulfide bonds of mucins, thereby diminishing the capacity of mucin gel-formation [9]. Colonization of gastric mucosa is facilitated by urease, which generates ammonia neutralizing the acidic environment of the stomach [10, 11], and is followed by the reduction of mucus viscosity and elasticity [12, 13]. In the case of strains positive for cytotoxin associated gene A (CagA) protein, colonization results in disruption the cell junctions and loss of cell polarity [14–16]. The cell damage induces infiltration of inflammatory cells including neutrophils, macrophages and lymphocytes and excessive gastrin versus decreased somatostatin production [17, 18]. This results in an increased secretion of hydrochloric acid and movement of the gastric content with microorganisms into the duodenum, thus increasing the colonization area [19]. *H. pylori* infection may be asymptomatic or symptomatic with lesions, which arise after prolonged exposure to hydrochloric acid in the case of gastric or duodenal ulcers [20–22]. Initially active gastritis induced by *H. pylori* can transform into atrophic gastritis and then to neoplastic lesions and promote the development of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (0.1%), or gastric adenocarcinoma [23–25]. Long-term colonization of gastric epithelial cells by *H. pylori* depends on various *H. pylori* surface adhesins including: the blood group antigen-binding adhesin A (BabA) and sialic acid binding adhesin (SabA), adherence-associated lipoprotein A (AlpA) and B (AlpB), *Helicobacter* outer membrane protein Z (HopZ), outer membrane protein A (OpiA) and proteins binding the host extracellular matrix components (ECM) [26–32]. Lipopolysaccharide (LPS) of *H. pylori* contains long-chain fatty acids and in the O-specific part there are sugar moieties similar to human Lewis (Le) blood-group antigens, which interact with corresponding sugar compounds of gastric mucin [33–37]. Among mucins, which are exposed on gastric epithelial cells the secretory mucin 5 (MUC5AC) is dominanting. This mucin can undergo modification to Le antigens, which play a role of receptors to *H. pylori* during infection [2, 37]. In humans Le antigens, especially Leb and LeX as well as sialylated LeX are the major putative receptors on gastric epithelial cells of the *H. pylori* infected host that bind *H. pylori* via BabA and SabA, respectively [27, 38–40]. A heterogeneity among *H. pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA is postulated as pathogen fitness to diverse human population [41]. Bäckström et al. (2004) showed that 70% of Swedish and U.S. *H. pylori* clinical isolates exhibited Leb binding but the *babA* gene was present in each of 10 Leb non-binding strains. Leb non-binding strains also possess silent *babA* gene, which can be activated by recombination to *babB* locus. At this locus, a BabB/A chimeric adhesin is expressed and is subject to phase varaition (ON/OFF switching) [42]. Concerning SabA it's expression is also controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction signal [43]. Various studies showed that MUC5AC with deposition of Le determinants is a key component of human gastric mucosa involved in *H. pylori* colonization. However, the knowledge about the influence of live bacteria or their soluble components on MUC5AC production as well as Le antigens deposition and management of *H. pylori* attachment to gastric epithelial cells and then colonization is insufficient. In this study, by using two *Caviae porcellus* (guinea pig) models: a model of primary gastric epithelial cells and a model of experimental *H. pylori* infection, we focused on the relation between MUC5AC and LeX/LeY production in response to gastric epithelial cell exposure in vivo or in vitro to *H. pylori* reference LeX/Y positive strain or soluble components of these bacteria, and the effectiveness of epithelial cell colonization. We considerd both the host and bacterial LeX/LeY components in the course of *H. pylori* adhesion to gastric epithelial cells on guinea pig model.

Materials and methods

H. pylori strains and culture conditions

Helicobacter pylori reference strain CCUG 17874 (Culture Collection, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden) positive for vacuolating cytotoxin A (VacA) and CagA proteins as well as for LeX and LeY determinants in LPS, which were confirmed previously by immunotyping with anti-LeX or anti-LeY antibodies [44], was used in this study. *H. pylori* bacteria were stored at − 80 °C in Trypticase Soy Broth (TBS) containing 10% glycerol. Bacteria were cultured under

microaerophilic conditions according to the previously described procedure [45].

Stimuli

Glycine acid extract (GE) from the reference *H. pylori* strain CCUG 17874 was a source of surface *H. pylori* antigens, which were extracted using 0.2 mol/l glycine buffer, pH 2.2, as previously described [46, 47]. Protein composition of GE was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot - Immuno blot (Milenia® Blot *H. pylori*, DPC Biermann, GmbH, Bad Nauheim, Germany), with the reference serum samples from patients infected with *H. pylori* [48]. Major proteins in GE recognized by sera from *H. pylori* infected patients were: 120 kDa (CagA), 87 kDa (VacA), 66 kDa (UreB), 60 kDa (Hsp), 29 kDa (UreA), between 66 and 22 kDa. The protein concentration in GE was 600 μg/ml (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, ThermoScientific, Wlatman, WY, United States). GE contained < 0.001 EU/ml of LPS, as shown by the chromogenic *Limulus amebocyte* lysate test (Lonza, Braine-Alleud, Belgium). GE was applied at 10 μg/ml. Recombinant CagA protein - rCagA (a kind gift from Antonello Covacci, IRIS, Siena, Italy), was used at 1 μg/ml. A recombinant fragment of CagA antigen of *H. pylori*: nt 2777 to nt 3465 of *cagA* gene was used. It was expressed (QIAexpress System, Qiagen, Hilden, Germany) in *E. coli* as a fusion protein (about 26 kDa size) with a 6 His-tail in front of a 230 aa polypeptide of CagA. The protein was purified by the Ni^{2+} ⁻NTA agarose column, and checked for serological activity by the enzyme immunoassay [49, 50]. Due to patent claims of *H. pylori* urease the UreA subunit from *H. acinonychis* isolated from the acidic environment of cheetah stomach was used as a homoloque of *H. pylori* protein (97% homology). The urease gene was amplified by PCR, as previously described [51], using chromosomal DNA as a template and oligonucleotides hisure-A-up and hisure-A-dn as primers. DNA encoding six histidines (His6-tag) was carried by oligonucleotide hisure-A-dn. The obtained PCR product of 737 bp was digested with enzymes *KpnI* and *NheI* and cloned into the commercial vector pBAD (Stratagene, California, United States). The resulting plasmid, pMD1, was verified by restriction analysis and nucleotide sequencing. pMD1 was used to transform the *E. coli* strain DH5α and the recombinant strain was used to overproduce UreA by the addition of arabinose 0.05%. A 27 kDa protein was visualized on a coomassie blue stained gel and purified on Ni-NTA superflow agarose (Qiagen) followed by gel filtration on Superose 6resin. UreA was used at 5 μg/ml. LPS from the reference strain of *H. pylori* CCUG 17874 was prepared by hot phenol-water extraction. Whole cell lysates were pretreated with proteinase K (Sigma, St Louis, MI, United States). Crude extraction of LPS from bacteria was performed with 45% aqueous phenol at 68 °C for 30 min. The LPS preparation was purified by the treatment with RNase A, DNase II and proteinase K (Sigma), and by ultracentrifugation at 100000×*g* at 4 °C, for 18 h [52–54]. *H. pylori* LPS and control LPS of *E. coli* (serotype O55: B5; Sigma) were used at 25 ng/ml. The antigen concentrations were adjusted experimentally or adopted from previous studies [55–57].

H. pylori infection in Guinea pigs

Adult, three-month-old, 400–600 g of weight male Himalayan *Cavia porcellus* (guinea pigs) were used in the experiments. Animals were bred in the Animal House at the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz (Poland), kept in cages with free access to drinking water and fed with standard chow. The experiments were approved by the Local Ethics Committee LKE9 (Decision 58/ŁB45/2016). The animal study groups consisted of guinea pigs ($n = 15$), which were inoculated per os three times (at two-day intervals) with 1 ml of sterile complete *Brucella* broth using a feeding needle (control group; $n = 5$), or with 1 ml of freshly prepared suspension of *H. pylori* (1×10^{10} colony forming units - CFU)/ml; $n = 10$). Before the administration of complete *Brucella* broth or *H. pylori* suspension, the animals obtained orally 1 ml of 0.2 M $NaHCO_3$ to quickly neutralize the acidic pH of the stomach. 7 and 28 days after the last dose of *H. pylori* the guinea pigs were euthanized, and biological samples were collected for further study. *H. pylori* status was confirmed according to previously described methods [45, 57]. Anti-*H. pylori* IgG/IgM antibody content in the serum samples, and the level of *H. pylori* antigens in the stool were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Histopathological methods were used to detect *Helicobacter*-like organisms (HLO) and inflammation whereas polymerase chain reaction (PCR) was applied to detected *cagA* and *ureC* gene sequences in the guinea pigs gastric tissue.

Cell cultures

Primary gastric epithelial cells were obtained according to the previously described procedures [58–60], with some modifications. The guinea pig was euthanized by overdosing sodium barbiturate (Morbital, Biowet, Poland), the stomach was isolated, rinsed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), pH 7.4 (Sigma) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml) and amphotericin B (0.025 mg/ml) (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Poland), homogenized and then tripsinized (15 min., room temp). Next, 2% bovine serum albumin (BSA) solution (Sigma) in HBSS was added to homogenates, which were then

centrifuged at 3000×*g* for 15 min. The supernatant was removed and the pellet was suspended in 5% BSA in Dulbecco's Modified Eagle's *medium (*DMEM) (Sigma) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml) and amphotericin B (0.025 mg/ml) (Polfa). Cell suspensions 2×10^6 cells/ml were added to the wells of 6-well plates (Becton Dickinson, USA), and incubated for 24 h (5% CO_2, 37 °C) to adhere. Unbound cells were washed out with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 and the remaining cells were cultured with DMEM and Ham's F-12 1: 1 (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonicacid (HEPES) (Sigma), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml), amphotericin B (0.025 μg/ml), L-glutamine (2 mM/ml) (Polfa), epidermal growth factor (Sigma) 0.01 μg/ml and 0.005% dexamethasone solution in complete RPMI-1640 culture medium (cRPMI) (Sigma). Every 48 h, the medium was changed and after 8 days of cultivation, confluent monolayers were treated with 0.25% trypsin (BIOMED-LUBLIN, Lublin, Poland) and transferred to breeding bottles. After 14 days cells were used for testing.

Evaluation of MUC5AC and LeX or LeY dependent *H. pylori* adhesion to Guinea pig primary gastric epithelial cells

Primary gastric epithelial cells (1×10^6 cell/ml, 1 ml) were cultured in DMEM: F12 medium (37 °C, 5% CO_2) in wells of a 6-well culture plates containing glass coverslips (ThermoScientific, USA). Unstimulated cells (control) or cells stimulated for 24 h with selected *H. pylori* antigens: GE 10 μg /ml, CagA 1 μg/ml, UreA 5 μg/ml and *H. pylori/E. coli* LPS (control), 25 ng/ml or for 2 h with live *H. pylori* (2×10^7 CFU/ml) were fixed with 4% formaldehyde solution, 20 min, room temp., and then washed 3 times in PBS. For increasing cell permeability cells were treated with 0.2% Triton-X-100 for 10 min and then washed 3 times as before. After blocking an unbound glass with 3% BSA in PBS, 1 h, cells were used for further procedures.The production of mucin and Le X or Le Y determinants was evaluated by incubating cells with primary mouse anti-MUC5AC antibodies (MyBiosource, USA), diluted 1: 200 in PBS/BSA or anti-Le X/Le Y antibodies (Dako, Glostrup, Denmark), 2 μg/ml, for 2 h at room temp. After washing the excess of antibodies away, cells were incubated for 1 h in the dark with sheep anti-mouse immunoglobulins antibodies (100 μl) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma), diluted 1: 64 in PBS/BSA. In parallel, cells exposed to *H. pylori* antigens, treated or not treated with anti-MUC5A antibodies or anti- LeX/LeY antibodies (Dako), and then incubated with live *H. pylori* (1 ml, 2×10^7 CFU/ml, 2 h, 37 °C, 5% CO_2) were used. The unbound bacteria were washed out, and cells were incubated for 1 h with rabbit anti-*H. pylori* antibodies - FITC (100 μl, 1:200 in BSA/PBS) (MyBiosource). Cells were then stained with Texas Red-X phalloidin (Thermo Scientific) solution (2.5 μg/ml), 15 min at room temp, and with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) solution (2.5 μg/ml) at the same conditions. Slides were mounted in a DPX balsam (Surgipath, Great Britan) and then imaged in a confocal microscope (Leica TCS SPE) at a wavelength for FITC 495 nm (excitation), 519 nm (emission); for phalloidyne 591 nm (excitation), 608 nm (emission) and for DAPI 358 nm (excitation), 461 nm (emission), at 640× magnification. In all experiments, controls of antibodies were set to exclude non-specific reactions. Three independent experiments and replications were performed.The production of MUC5A or LeX/LeY was assessed quantitatively on the basis of green fluorescence intensity measured using a multifunctional Victor 2 reader (Wallac, Oy, Turku, Finland), and by fluorescence imaging [56, 61].

Detection of MUC5AC, LeX and *H. pylori* bound to the Guinea pig gastric tissue

Guinea pig gastric tissue specimens (7 and 28 days after inoculation with *H. pylori* or control) fixed in formalin, embedded in paraffin were cuted to tissue sections (4 μm), which were placed on the adhesive slide and then deparaffinized. For antigen exposure they were heated (95–100 °C) in sodium citrate buffer pH 6.0, 20 min, cooled to room temp. and washed 3 times in PBS. The slides were blocked for 1 h (BSA/PBS) and washed as above. MUC5AC was stained with mouse anti-MUC5AC antibodies 1:100 (MyBiosource, USA), whereas LeX with anti-LeX antibodies (DAKO), 2 μg/ml, overnight at 4 °C. After washing 5 times in Tris-Buffered Saline with Tween 20 (TBST), pH 7.4, sheep anti-mouse IgG antibodies conjugated with FITC (Sigma),1:64, were added on slides, which were incubated for 20 min at room temp. Cell nuclei were stained with DAPI solution (2.5 μg/ml) or phalloidine, 15 min, at room temp, as above. Intensity of fluorescence was measured by using the software ImageJ 1.48v (National Institute of Health, United States) under fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1, Germany) at an appropriate wavelength: for FITC 495 nm (excitation)/519 nm (emission); for phalloidyne 591 nm (excitation)/608 nm (emission), and for DAPI 358 nm (excitation)/461 nm (emission), at 100× magnification [56, 61]. The ability of *H. pylori* to bind MUC5AC or LeX was assessed on tissue sections preincubated with blocking anti-MUC5AC or anti-LeX antibodies, or control unblocked sections, which were then incubated with *H. pylori* (2×10^7 CFU/ml) for 2 h. After washing the specimens were stained with rabbit

anti-*H. pylori* antibodies FITC and with DAPI, and fluorescence intensity was evaluated by imaging in fluorescence microscope as above.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). The differences between groups were tested using the non-parametric Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis test. For statistical analysis the Statistica 12 PL software was used. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

MUC5AC and LeX/LeY production by Guinea pigs gastric epithelial cells in the milieu of live *H. pylori* or soluble compounds of these bacteria in relation to *H. pylori* adhesion – In vitro and in vivo models

We were focused on answering the question whether live *H. pylori* rods or their soluble antigens modulate MUC5AC production by the gastric epithelial cells and LeX/LeY deposition, and how it influences the process of colonization of gastric mucosa by *H. pylori* using an in vitro model of primary gastric epithelial cells derived from the guinea pig gastric tissue. We also used an in vivo model of experimental infection with *H. pylori* in these animals. Production of MUC5AC was significantly increased after 24 h stimulation of guinea pig primary gastric epithelial cells with *H. pylori* surface components GE (10 μg/ml), CagA (1 μg/ml), UreA (5 μg/ml), *H. pylori* LPS (25 ng/ml) as well as after 2 h stimulation with live *H. pylori* (2×10^7 CFU/ml) (Fig. 1a), $p < 0.05$ in Kruskal-Wallis test. The highest fluorescence after staining the cells with anti-MUC5AC and secondary FITC labeled antibodies was demonstrated for cells treated with *H. pylori* LPS. Increased production of MUC5AC was corelated with the elevated levels of LeX in all variants of cell cultures, $p < 0.05$ in Kruskal-Wallis test, especially in the cell cultures treated with live *H. pylori* or *H. pylori* LPS. Deposition of LeY in primary gastric epithelial cells was elevated in cell cultures exposed to whole *H. pylori*, UreA and *H. pylori* LPS (Fig. 1a i). Similarly, MUC5AC production increased in the gastric tissue of guinea pigs inoculated experimentaly with *H. pylori* (Fig. 1b). Only in the gastric mucosa of infected but not of uninfected animals the gastric tissue was positive for HLO, *ureC/cagA* and infiltrated by immunocompetent cells. After 28 days from inoculation of animals with *H. pylori* the number of eosinophils and lymphocytes increased, which indicated the development of chronic inflammatory response. *H. pylori* antigens were detected in stool samples and anti-*H. pylori* antibodies in the sera of infected but not of uninfected animals (7 and 28 days post infection). Significantly higher levels of MUC5AC were demonstrated in animals 7 (acute phase of infection) than 28 days after the last *H. pylori* inoculation (chronic phase of infection) (Fig. 1b i, 1b ii). The production of MUC5AC was linked with the elevated deposition of LeX in gastric tissue, which was stronger after 7 than 28 days post infection (Fig. 1 c i, ii), $p < 0.05$ in Kruskal-Wallis test.

The mucin production and LeX or LeY deposition were then compared to the effectiveness of *H. pylori* adhesion to guinea pig gastric epithelial cells in vitro and in vivo. To determine whether MUC5AC or LeX/LeY mediated the adhesion of *H. pylori* to the guinea pig gastric epithelium we used guinea pig primary gastric epithelial cells preincubated or not with *H. pylori* components and then untreated or treated with anti-MUC5AC, anti-LeX or anti-LeY blocking antibodies (Fig. 2a i, ii, iii) before the exposure to live *H. pylori*. The results presented in Fig. 2a i, ii, iii show that increased adhesion of *H. pylori* to guinea pig primary gastric epithelial cells was related to the elevated production of MUC5AC in these cells, in response to live *H. pylori* and soluble components of these bacteria, and was completely abrogated by anti-MUC5AC antibodies (Fig. 2a i, ii, iii). Similarly, Fig. 2b i, ii show the results for guinea pig gastric tissue specimens untreated or treated with anti-MUC5AC antibodies and then exposed to live *H. pylori* in vitro. The attachment of *H. pylori* to guinea pig gastric tissue specimens was diminished by the pretreatment of tissue sections with anti-MUC5AC antibodies (Fig. 2b i, ii, iii). Furthermore, it was showed that LeX and LeY determinants mediated the binding of *H. pylori* to primary gastric epithelial cells because *H. pylori* binding to these cells was significantly diminished by pretreatment the cells with anti-LeX or anti-LeY antibodies (Fig. 2a i). Similarly, the attachment of *H. pylori* to gastric tissue specimens was abrogated after treatment of specimens with anti-LeX antibodies (Fig. 2c i, ii, iii).

Live *H. pylori* stimulated MUC5AC significantly higher that of *E.coli* LPS. Similarly, the deposition of LeX determinants was higher in response to live *H. pylori* than to LPS *E.coli* (Fig. 1a i). The adhesion assay showed that MUC5AC, which was exposed on the cells treated with live *H. pylori* or LPS *E.coli* was used by *H. pylori* for binding. This was confirmed by blocking of *H. pylori* attachment with anti-MUC5AC (Fig. 2 b i). However, it is possible that *E. coli* LPS could stimulated other than LeX or LeY determinats, not considered in this study, that could mediate adhesion of *H. pylori*.

Because LPS of *H. pylori* strain used in this study contains LeX and LeY determinants we asked whether these determinants mediate bacterial binding to primary gastric epithelial cells. For binding experiments

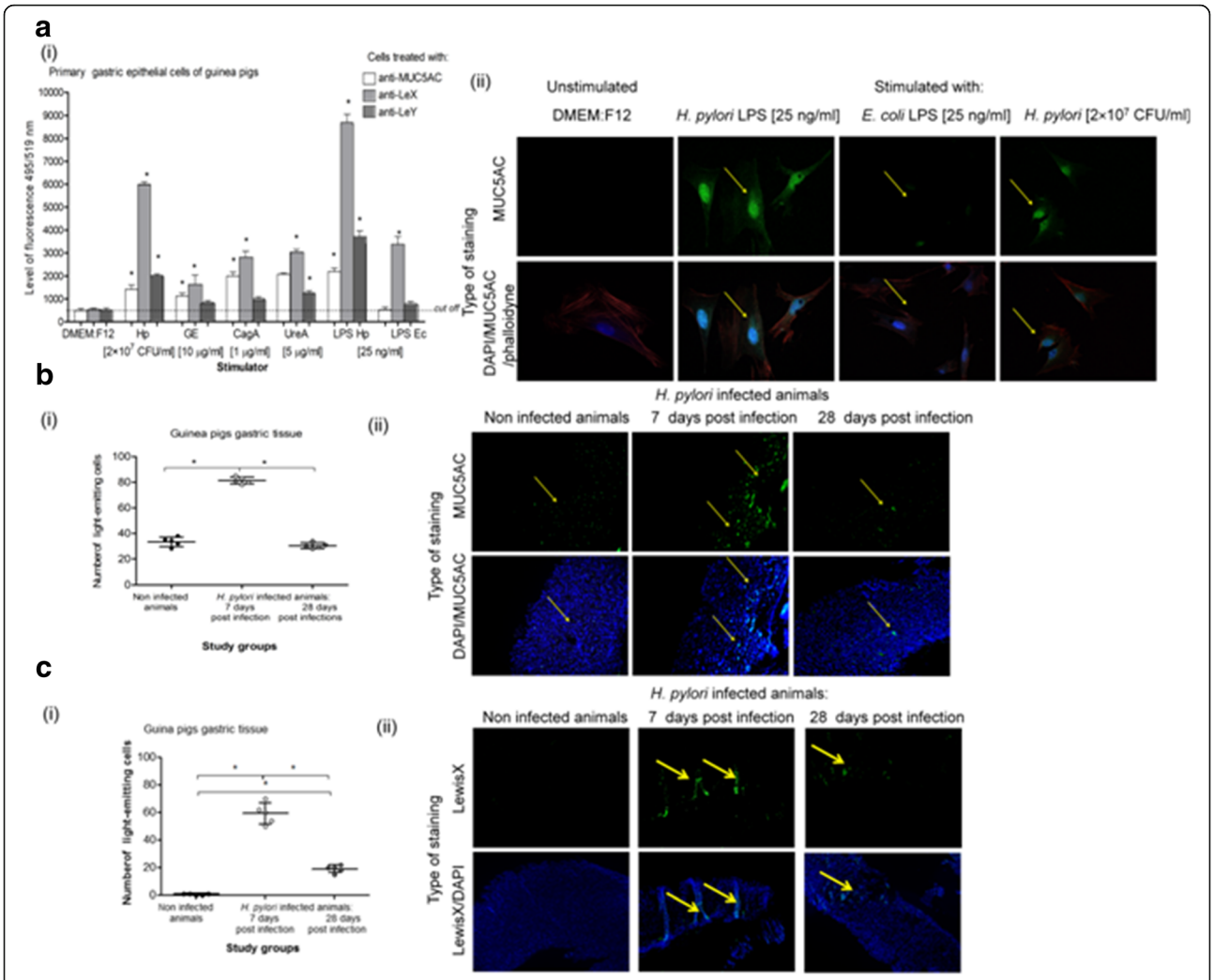


Fig. 1 MUC5AC and Lewis X/Y production by guinea pig gastric epithelial cells. MUC5AC and Lewix X/Y was evaluated on the basis of the intensity of fluorescence of guinea pig primary gastric epithelial cells or gastric tissue specimens stained with mouse anti-MUC5AC or anti-LeX/anti-LeY antibodies (Ab) and secondary antibodies conjugated with fluoresceine isothiocyanate (FITC) and counterstained with DAPI or phalloidine. a- guinea pig primary gastric epithelial cells non treated (in culture medium alone) or treated with selected *H. pylori* components: for 24 h with glycine acid extract – GE (10 μg/ml), urease subunite A – UreA (5 μg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 μg/ml), *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS Hp) or *E.coli* LPS –LPS Ec (25 ng/ml) or for 2 h with live *H. pylori* - Hp(2×10^7 colony forming units - CFU/ml), (i) intensity of fluorescence measured in a fluorescence reader at 495 nm (excitation) and 519 nm (emission), mean values ± SD. * Statistical significance for $p < 0.05$ assessed by non parametric *U* Mann-Whitney test, (ii) representative images from a confocal microscope (Leica TCS SPE) at wavelengths: FITC - 495 nm excitation and 519 nm emission, DAPI – 345 nm excitation and 455 nm emission, phalloidine – 591 nm excitation and 608 nm emission (630 × magnification). b MUC5AC and c Lewis X imaging in the gastric tissue of guinea pigs experimentally infected with *H. pylori* (7 and 28 days after inoculation, $n = 10$) or control animals ($n = 5$), (bi, ci) intensity of fluorescence measured using the software ImageJ version 1.48v (National Institute of Health, United States) at 495 na (excitation) and 519 nm (emission), mean values±SD. Statistical significance for $p < 0.05$ assessed by the non parametric Kruskal-Wallis test. * Statistically siginificant values for infected animals (7 and 28 days after inoculation) vs control animals and for infected animals 7 days post infection vs 28 days after the last inoculation with *H. pylori*, b ii representattive images of MUC5AC production and c ii representative images of LeX production in guinea pigs gastric tissue from fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany) at wavelengths: FITC 495 nm excitation and 519 nm emission, DAPI 345 nm excitation and 455 nm emission, (100 × magnification)

H. pylori untreated or treated with anti-LeX or anti-LeY antibodies were used. The binding effectiveness of *H. pylori* pre-treated with anti-LeX alone or in combination with anti-LeY antibodies was diminished significantly, 38 ± 0.5% and 44 ± 0.8%, respectively, $p < 0.05$ in U Mann-Whitney test (Fig. 3)

Discussion

Since the description of *H. pylori* for the first time by R. Warren and B. Marshall in 1983, many aspects related to the host gastric epithelial cells colonization and pathogenesis of *H. pylori* have been intensively studied in order to understand the mechanisms of infection

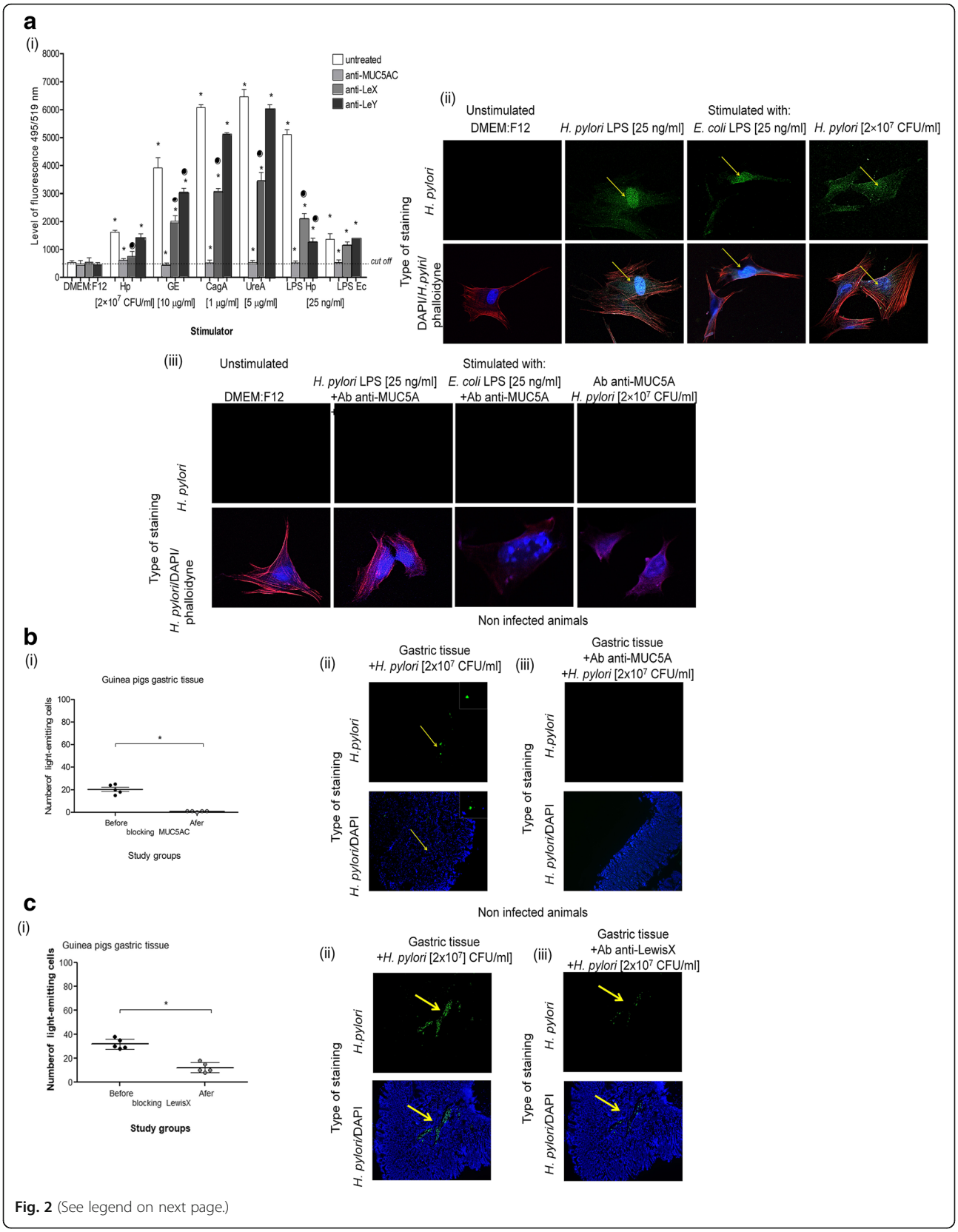


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 2 Adhesion of *H. pylori* to guinea pig gastric epithelial cells mediated by MUC5AC mucin and Lewis (Le)X/LeY determinants. Binding of *H. pylori* to guinea pig primary gastric epithelial cells and gastric tissue specimens was evaluated by imaging *H. pylori* stained with anti-*H. pylori* antibodies (Ab) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) in a fluorescence reader or confocal microscope, counterstained with DAPI or phalloidine. a – guinea pig primary gastric epithelial cells non treated (in culture medium alone) or treated with selected *H. pylori* components: for 24 h with glycine acid extract – GE (10 μg/ml), urease subunite A – UreA (5 μg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 μg/ml), *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS Hp) or *E.coli* LPS –LPS Ec (25 ng/ml) or for 2 h with live *H. pylori* – Hp (2×10^7 colony forming units - CFU/ml) were prepared. Further, cells non-treated (control of adhesion) or blocked with anti-MUC5AC or with anti-LeX/LeY antibodies were used in adhesion assay. a i – the intensity of fluorescence measured in a fluorescence reader at 495 nm (excitation) and 519 nm (emission), mean values ±SD. * Statistical significance for cells treated with an individual component *vs* untreated cells or # treated with individual antibody vs untreated cells (control cells), $p < 0.05$ in non parametric *U* Mann-Whitney test. Representative images of primary gastric epithelial cells untreated (a ii) or treated (a iii) with anti-MUC5AC antibodies before *H. pylori* binding experiments, stained with anti-*H. pylori* FITC antibodies in confocal microscope (Leica TCS SPE), at 495 nm excitation and 519 emission for FITC, 345 excitation/455 emission for DAPI and 591 nm excitation/608 nm emission for phalloidine (640 magnification). Gastric tissue specimens from non infected guinea pigs untreated or treated with anti-MUC5AC (b) or anti-LeX (c) blocking antibodies before 2 h exposure to live *H. pylori* (2×10^7 colony forming units (CFU)/ml). bi and Ci – intensity of fluorescence measured using the software ImageJ version 1.48v (National Institute of Health, United States) at 495 excitation/519 emission, mean values ±SD. *Statistically significant values for gastric tissue blocked with anti-MUC5AC or anti-LeX antibodies vs unblocked specimens. Representative images of *H. pylori* adhesion to the guinea pig gastric tissue non treated with anti-MUC5AC (bii) or anti-LeX (cii) antibodies vs gastric tissue treated with such antibodies (b iii, iii) from fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany), at 495 nm excitation/519 nm emission for FITC, 345 nm excitation/455 nm emission for DAPI and 591 nm excitation/608 nm emission for phalloidine (100 × magnification)

especially in view of its chronic nature and pathological consequences [7, 62–65]. Studies on the pathogenesis of *H. pylori* infections require appropriate models, both cellular in vitro models and in vivo animal models [66–68]. The most suitable model is *Caviae porcellus* (guinea pig), due to the anatomy and physiology of its stomach, which is similar to the human stomach, lack of natural *H. pylori* infection, ability to produce a homologue of human proinflammatory interleukin (IL) 8, and to develop both humoral and cellular specific immune responses to these bacteria as well as the need of external source of vitamin C [67, 68]. The phenomenon of *H. pylori* adhesion to the surface of gastric epithelial cells is crucial for colonization and maintenance of infection, which is accompanied by a chronic inflammatory reaction. The aim of this study was to evaluate the role of *H. pylori* and their solube components in MUC5AC production by gastric epithelial cells and the exposure of LeX/LeY determinants and their role in the attachment of these bacteria to the gastric tissue. Whether soluble components of these bacteria modulate the production of mucin components, including Lewis antigens and how they favor colonization of the gastric tissue and the maintenance of infection by these bacteria is not completely understood. In this study we used primary gastric epithelial cells derived from the guinea pig stomach as well as an in vivo model of experimental infection in these animals, lasting for 7 or 28 days, to follow the production of MUC5AC and deposition of LeX/LeY in the milieu of selected *H. pylori* components in cell cultures or in response to gastric tissue infection. The question was whether there is a relationship between the production of MUC5AC and LeX/LeY deposition, and the binding effectiveness of *H. pylori* to gastric epithelial cells. Mucin MUC5AC was suggested to be the main source of host receptors for *H. pylori* during colonization of gastric tissue in humans [69]. We showed that MUC5AC was produced by guinea pig primary gastric epithelial cells after 24 h incubation with *H. pylori* antigens used in this study such as: GE, CagA, UreA, LPS and after 2 h

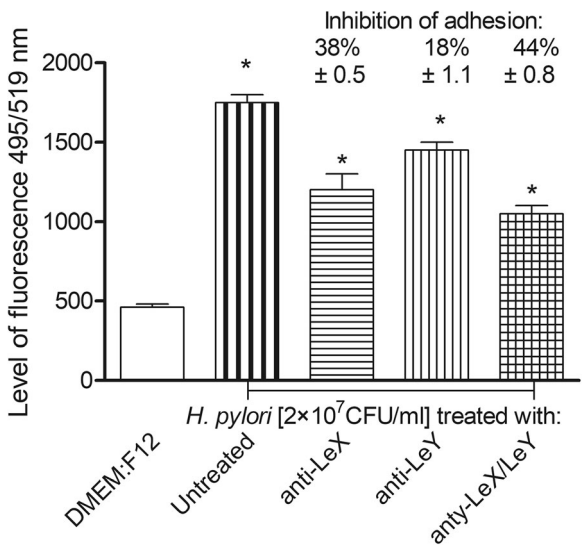


Fig. 3 Involvement of *H. pylori* Lewis (Le) X or LeY determinents in adhesion to guinea pig primary gastric epithelial cells. Binding of *H. pylori* to gastric epithelial cells was evaluated by imaging *H. pylori* stained with anti-*H. pylori* antibodies (Ab) conjugated with fluoresceine isothiocyanate (FITC). Gastric epithelial cells were cocultured for 2 h with live *H. pylori* (2×10^7 colony forming units – CFU/ml) non treated or treated for 30 min with anti-LeX, anti-LeY or both types of antibodies. The intensity of fluorescence was measured in a fluorescence reader at 495 nm excitation/519 nm emission, mean values ±SD. * Statistical significance for cells exposed to *H. pylori* untreated with anti-LeX or anti-LeX and anti-LeY antibodies, *vs* cells exposed to *H. pylori,* treated such antibodies, $p < 0.05$ in the non parametric *U* Mann-Whitney test

exposure to live bacteria. MUC5AC was most intensively produced in response to stimulation with *H. pylori* LPS but not *E. coli* LPS. Probably this is because *H. pylori* LPS contains fucosylated oligosaccharide antigens identical to human antigens Lea, Leb, sLeX, sLeY, H type 1 and A, B antigens of the ABO blood group system, whose expression changes during the inflammatory response [35, 70–73]. *Van den Brink* et al. (2000) and later *Park* et al. (2015) confirmed the expression of MUC5AC in the human stomach and demonstrated the importance of MUC5AC in gastric mucosa colonization by *H. pylori* [74]. In humans binding of *H. pylori* with Leb and sialylated determinants of MUC5AC such as sLeX in the gastric mucosa is mediated by surface *H. pylori* adhesins such as BabA and SabA, respectively [27, 28, 31, 36, 75]. *H. pylori* with a deletion of the *babA* gene was found clearly less effective in binding mucin than wild strain [42]. In our study the increased production of MUC5AC in in vitro model of guinea pig primary gastric epithelial cells was related to elevated deposition of Lewis determinants: LeX and LeY in response to live *H. pylori*, UreA and *H. pylori* LPS. Other *H. pylori* components such as GE or CagA and the reference LPS *E. coli* increased the deposition of LeX rather than LeY. Considering the islad-like character of *H. pylori* infection it is possible that different *H. pylori* soluble components may influence locally the production of gastric mucus containing MUC5AC as well as LeX/Y, which can be involved in binding these bacteria in dose dependent manner. Interaction of *H. pylori* with mucins and colonization effectiveness were also confirmed by the study on three cell lines grown on "transwel" type filters: HT29 (non-mucin secreting line), HT29-MTX (native, mucin secreting), HT29- MTX-E13 (containing an adherent mucus layer). *H. pylori* colonized the HT29-MTX-E13 cells most intensively, while the HT29 line was not colonized by these bacteria [76]. *Park* et al. (2015) showed *H. pylori* binding to mucins (including MUC5AC) isolated from gastric juice and gastric biopsies from patients with functional dyspepsia [74]. *Perrais* et al. (2014) using in vitro model of gastric cancer cells KATO III looked at the molecular mechanism driven by *H. pylori* that upregulate mucin gene expression in the stomach [77]. The strong MUC5AC gene expression in cells infected with $UreB^{-}$ isogenic mutant but not with wild bacteria producing urease was showed. It indicated that *H. pylori* urease may downregulate MUC5AC expression in already transformed gastric cancer cells although this phenomenon does not have to refer to primary cells, which may possess diferent mechanisms.

In our experimental model of *H. pylori* infection in guinea pigs, the infection was confirmed, both 7 and 28 days after the last inoculation by histological, molecular (*ureC*, *cagA* PCR) and serological methods (ELISA for anti-*H. pylori* IgG and immunoenzymiatic test for the detection of *H. pylori* antigens in stool samples). Gastric mucosa of infected animals was infiltrated by eosinophils and lymphocytes to the higher level 28 than 7 days after inoculation indicating a development of chronic inflammatory response during the course of infection. In this model we focused on the MUC5AC production and LeX exposure during *H. pylori* infection, which was selected on the basis of in vitro experiments on the guinea pig primary gastric epithelial cells showing a domination of LeX rather than LeY deposition in response to live *H. pylori* or soluble bacterial compounds. These biomarkers were increased, however, more effectively after 7 than 28 days post inoculation. Stronger mucin production and LeX deposition in the first stage of infection probably is necessary for these bacteria for colonization of gastric niche, whereas during the chronic phase of infection interactions of *H. pylori* with gastric epithelial cells rather than with gastric mucin are more important to the maintenance of infection. Downregulation of mucin production, which reperesent the first line of host defence against infectious agents in the later phase of infection can protect bacteria from antimicrobial propertis of mucin. *Park* et al. (2015) showed that in patients with chronic *H. pylori* infection the MUC5AC production was even lower than in uninfected individuals [74]. In this study using guinea pig primary gastric epithelial cells and tissue sections of infected animals, we showed that increased MUC5AC production and Lewis antigens deposition, especially of LeX, in the milieu of *H. pylori* and their soluble antigens or during the experimental infection significantly improved the colonization process. Recently *Naughton* et al. 2013, showed an intensive binding of three *H. pylori* strains to mucins in the rat gastric and duodenal mucosa and duodenum [31]. *Navabi* et al. (2013) investigated the production rate and turnover of newly synthesised mucin in mice and analyzed the effects of early colonization and chronic infection with *H. pylori* [78]. They evaluated metabolic incorporation of an azido GalNac analog (GalNaz) in the experiments with the whole animals infected with *H. pylori* strain SS1 during early colonization (7 days) and chronic infection (90 days). The *H. pylori* infection in mice reduced the rate of MUC1 but not MUC5AC. In our guinea pig model the increased MUC5AC production during early phase of infection was linked with enhanced deposition of LeX in gastric tissue whereas diminished mucin and LeX production was showed during chronic phase of infection. This indicate that *H. pylori* can modulate the environment of the stomach by impairement of the defence mechanisms, including mucin production. *Byrd* et al. (2000) showed on KATO III cells that MUC5AC production in response to *H. pylori* was not reversible within 24 h [79]. In early phase

of infection *H. pylori* need mucin receptors for tight adhesios. By contrast, downregulation of mucin production during later stage of *H. pylori*-host interaction may diminish clearence of pathogens and promote the maintenance of infection. The results of this study using antibodies that block the availability of MUC5CA and LeX or LeY for *H. pylori* have indicated the importance of these components of gastric mucosa in the adhesion of these bacteria to *Caviae porcellus* gastric epithelial cells. In conclusion, the experiments carried out in vitro on a cellular model and in vivo on guinea pigs infected with *H. pylori* confirmed the role of MUC5AC containing LeX and LeY determinants in *H. pylori* binding to gastric epithelial cells. It was also showed that both live *H. pylori* and soluble components of these bacteria were able to stimulate the production by gastric epithelial cells of MUC5AC containing LeX and LeY determinants and promote colonization. The elevation of MUC5AC production and modulation of deposition of LeX or LeY in gastric tissue in response to *H. pylori* antigens can be an important mechanism for the maintenance of infection, induction of chronic inflammatory response and deleterious effects on the level of gastric barrier during *H. pylori* infection. It is worth of mentioning that Lewis components, which are present in LPS of *H. pylori*, can mediate the interaction of these bacteria with gastric epithelial cells. It was confirmed by impairement of adhesion to guinea pig gastric epithelial cells of *H. pylori* treated with anti-LeX, anti-LeY or both types of antibodies. Previously, it was showed that LeX and LeY of *H. pylori* were involved in phagocytosis of these bacteria and induction of the immune complexes LewisX/Y-anti-LewisX/Y IgGwith proinflammatory potential [80]. In conclusion LeX/LeY determinants present in gastric mucin as well as *H. pylori* LeX/LeY determinants can be used by these bacteria for colonization of gastric mucosa of the host. *Skoog* et al., (2012) showed that expression of genes encoding important virulence factors of *H. pylori* such as BabA, SabA, CagA, UreA and flagellin is co-regulated in response to host mucins binding [81]. For instance the expression of the BabA and SabA adhesins, which is tightly regulated on this way, potentially permits the bacteria to adapt to the host gastric mucosa glycosylation during infection and to evoid the negative effects of inflammatory response [82].

Conclusions

MUC5AC production and deposition of LeX/LeY determinants were significantly elevated in response to live *H. pylori* or soluble components of these bacteria and positively correlated with *H. pylori* adhesion to the gastric mucosa on experimental model of guinea pig gastric epithelial cells in vitro and in vivo. Upregulation of MUC5AC/LeX/LeY by *H. pylori* in early phase of infection can promote successful colonization of gastric niche whereas downregulation of MUC5AC/LeX/LeY persistent infection and development of chronic inflammatory response, which can be followed by deleterious effects locally in the gastric tissue and potentially also systemically.

Abbreviations

AlpA: adherence-associated lipoprotein A; AlpB: adherence-associated lipoprotein B; BabA: blood antigen-binding adhesin A; BSA: bovine serum albumin; CagA: cytotoxin associated gene A antigen; CFU: colony forming unit; cRPMI: complete RPMI-1640 culture medium; DAPI: 4′,6-diamidino-2-phenylindole; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMSO: dimethyl sulfoxide; ECM: extracellular matrix; EDTA: ethylenediaminetetraacteic acid; ELISA: Enzyme-likned immunosorbent assay; FCS: fetal calf serum; FITC: fluorescein isothiocyanate; GE: glycine acid extract; H&E: hematoxilin and eosin staining; HBSS: Hank's Balanced Salt Solution; HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonicacid; HLO: *Helicobacter*-like organisms; HopZ: *Helicobacter* outer membrane protein Z; Le: Lewis antigen; LPS: lipopolysaccharide; MALT: mucosa-associated lymphoid tissue; MUC5AC: mucin 5; OpiA: outer membrane protein A; PBS: phosphate buffered saline; PCR: polymerase chain reaction; SabA: sialic acid binding adhesin; SD: standard deviation; TBS: Trypticase Soy Broth; TBST: Tris-Buffered Saline with Tween 20; VacA: vacuolating cytotoxin A

Acknowledgements

We want to thank A. Covacci, (IRIS, Siena, Italy) for providing rCagA protein and J. Cwynar for language correction.
Part of the experiments was performed using equipment of the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

WG, MC substantially contributed to the study conception, planning experiments, data analysis and interpretation; WG carried out experiments and statistical analysis; MW derived the guinea pig primary gastric epithelial cell line; APM provided *H. pylori* LPS, MO and KH provided subunit A of urease. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

All animal experiments were approved by the Local Ethics Committee LKE9 (Decision 58/ŁB45/2016).

Consent for publication

Not Applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

[1]Division of Gastroimmunology, Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Poland. [2]Department of Microbiology, School of Natural Sciences, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland. [3]Laboratory of Molecular Bacteriology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG-MUG, Medical University of Gdańsk, 80-210 Gdańsk, Poland.

Received: 12 November 2018 Accepted: 19 February 2019
Published online: 06 March 2019

References

1. Tarnawski A. Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair. In: Bioregulation and its disorders in gastrointestinal tract. Tokyo: Blackwell Science Japan; 1998. p. 3–7.
2. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 2008;134:306–23.
3. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. Gastroenterology. 2008;135:41–60.
4. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1983;1:1273–5.
5. Schreiber S, Bücker R, Groll C, Azevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, et al. Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. Infect Immun. 2005;73:1584–9.
6. Bury-Moné S, Kaakoush NO, Asencio C, Mégraud F, Thibonnier M, De Reuse H, et al. Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? Helicobacter. 2006;4:296–303.
7. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:7533–8.
8. Windle HJ, Fox A, Ní Eidhin D, Kelleher D. The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem. 2000;275:5081–9.
9. Farnham KR, Dube DH. A semester-long project-oriented biochemistry laboratory based on *Helicobacter pylori* urease. Bioch Mol Biol Education. 2015;43:333–40.
10. Lee JH, Jun SH, Kim J, Baik SC, Lee JC. Morphological changes in human gastric epithelial cells induced by nuclear targeting of *Helicobacter pylori* urease subunit a. Microbiology. 2015;53:406–14.
11. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Ewoldt RH, McKinley GH, Bansil R, et al. Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. Biomacromolecules. 2007;8:1580–6.
12. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, et al. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:14321–6.
13. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest. 2001;107:767–77.
14. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;7:629–41.
15. Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. Cell Commun Signal .2011; 9:28.
16. Dunn BE, Phadnis SH. Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. Yale J Biol Med. 1998;71:63–73.
17. Ihan A, Gubina M. The immune response to *Helicobacter pylori*. Food Technol Biotechnol. 2014;52:204–9.
18. Schoep TD, Fulurija A, Good F, Lu W, Himbeck RP, Schwan C, Choi SS, et al. Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. PLoS One. 2010;5:e15042.
19. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev. 2010;23:713–39.
20. Mentis A, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2015;20:1–7.
21. Huang JY, Sweeney EG, Guillemin K, Amieva MR. Multiple acid sensors control *Helicobacter pylori* colonization of the stomach. PLoS Pathog. 2017; 13:e1006118.
22. Menaker RJ, Ceponis PJ, Jones NL. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. Infect Immun. 2004;72:2889–98.
23. Chmiela M, Michetti P. Inflammation, immunity, vaccines for *Helicobacter* infection. Helicobacter. 2006;1:21–6.
24. Wroblewski LE, Peek RM. Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori*. Cell Commun Signal. 2011;9:29.
25. Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Stączek P. Host patogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. World J Gastroenterol. 2017;23:1521–40.
26. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. 2002;297:573–8.
27. Aspholm M, Olfat FO, Norden J, Sonden B, Lundberg C, Sjöström R, et al. SabA is the *H pylori* hemaggutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. PloS Pathog. 2006;2:e110.
28. Sheu BS, Odenbreit S, Hung KH, Liu CP, Sheu SM, Yang HB, et al. Interaction between host gastric sialyl-Lewis x and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis b antigen. Am J Gastroenterol. 2006;101:36–44.
29. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock REW, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori:* analysis of the outer membrane protein families. Infect Immun. 2002;68:4155–68.
30. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikava Y, Kanegae Y, Saito I, et al. BabA mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. J Biol Chem. 2011;286:25256–64.
31. Naughton JA, Mariño K, Dolan B, Reid C, Gough R, Gallagher D, et al. Divergent mechanisms of interaction of *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* with mucus and mucins. Infect Immun. 2013;81:2838–50.
32. Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis. Toxins. 2017;9:101.
33. Muotiala A, Helander IM, Pyhälä L, Kosunen TU, Moran AP. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infect Immun. 1992;60: 1714–6.
34. Appelmelk BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, et al. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. Infect Immun. 1996;64:2031–40.
35. Moran AP, Aspinall GO. Unique structural and biological features of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Prog Clin Biol Res. 1998;397:37–49.
36. Moran AP, Gupta A, Joshi L. Sweet talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal track. Gut. 2011;60:1412–25.
37. Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, et al. *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. Gut. 2000;46:601–7.
38. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science. 1993;262:1892–5.
39. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 1998;279:373–7.
40. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. World J Gastroenterol. 2008;14:4265–72.
41. Hennig EE, Mernaugh R, Edl J, Cao P, Cover TL. Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. Infect Immun. 2004;72:3429–35.
42. Bäckström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Borén T, Arnqvist A. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. Proc Natl Acad Asci USA. 2004;101:16923–8.
43. Goodwin AC, Weinberger DM, Ford CB, Nelson JC, Snider JD, Hall JD, et al. Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal tranduction system. Microbiology. 2008; 154:2231–40.
44. Chmiela M, Wadstrom T, Folkesson H, Płaneta-Małecka I, Czkwianianc E, Rechcinski T, Rudnicka W. Anti-Lewix X antibody and Lewis X-anti-Lewis X immune complexes in *Helicobacter pylori* infection. Immunol Lett. 1998; 61:119–25.
45. Walencka M, Gonciarz W, Mnich E, Gajewski A, Stawerski P, Knapik-Dabrowicz A, et al. The microbiological, histological, immunological and molecular determinants of *Helicobacter pylori* infection in Guinea pigs as a convenient animal model to study pathogenicity of these bacteria and the infection dependent immune response of the host. Acta Biochim Pol. 2015; 62:697–706.
46. Logan SM, Trust TJ. Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. 1983;42:675–82.
47. Rechciński T, Chmiela M, Małecka-Panas E, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W. Serological indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. Microbiol Immunol. 1997;41:387–93.
48. Czkwianianc E, Chmiela M, Lawnik M, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in children with gastroduodenitis. Centr Eur J Immunol. 1997;22:240–7.
49. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:5791–5.
50. Xiang Z, Bugnoli M, Ponzetto A, Morgando A, Figura N, Covacci A, et al. Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a

recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1993;12:739–45.
51. Hinc K, Isticato R, Dembek M, Karczewska J, Iwanicki A, Peszyńska-Sularz G, et al. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. Microb Cell Factories. 2010;9:2.
52. Westphal O, Lüderitz O, Bister F. Über die extraktion von bakterien mit phenol-wasser. Z Naturforsch. 1952;78:148–15.
53. Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J Bacteriol. 1983;154:269–77.
54. Moran AP, Helander IM, Kosunen TU. Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides. J Bacteriol. 1992;174:1370–7.
55. Grebowska A, Moran AP, Matusiak A, Bak-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Rechciński T, et al. Anti-phagocytic activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide (LPS)-possible modulation of the innate immune response to these bacteria. Pol J Microbiol. 2008;57:185–92.
56. Miszczyk E, Walencka M, Rudnicka K, Matusiak A, Rudnicka W, Chmiela M. Antigen-specific lymphocyte proliferation as a marker of immune response in Guinea pigs with sustained *Helicobacter pylori* infection. Acta Biochim Pol. 2014;61:295–303.
57. Mnich E, Gajewski A, Rudnicka K, Gonciarz W, Stawerski P, Hinc K, et al. Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *Helicobacter pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion. Acta Biochim Pol. 2015;62:641–50.
58. Terano A, Ivey KJ, Stachura J, Sekhon S, Hosojima H, Mckenzie WN, et al. Cell culture of rat gastric fundic mucosa. Gastroenterology. 1982; 83:1280–1291.
59. Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. J Cell Science. 1992;101:219–31.
60. Stern AR, Stern MM, Van Dyke ME, Jähn K, Prideaux M, Bonewald LF. Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. Biotechniques. 2012;52:361–73.
61. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using image. Anat Rec. 2013;296:378–81.
62. Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin Sci. 2006;110:305–14.
63. Diaconu S, Predwscu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbinteanu-Braticevici C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. J Med Life. 2017;10:112–7.
64. Lamb A, Chen LF. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. J Cell Biochem. 2013; 114:491–7.
65. Nedrud JG. Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999;24:243–50.
66. Pautahidis T, Tsangaris T, Kanakoudis G, Vlemmas I, Iliadis N, Sofianou D. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in experimentally infected conventional piglets. Vet Pathol. 2001;38:667–78.
67. Sjunnesson H, Sturegard E, Hynes S, Willén R, Feinstein R, Wadström T. Five month persistence of *Helicobacter pylori* infection in Guinea pigs. APMIS. 2003;111:634–42.
68. Miszczyk E, Walencka M, Chmiela M. Animal models for the study of *Helicobacter pylori* infection. Post Hig Med Dośw. 2014;68:603–15.
69. Van de Bovenkamp JHB, Mahdavi J, Korteland Van Male AM, Büller HA, AWC E, et al. the MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. Helicobacter. 2003;8:521–53.
70. Simoons-Smit IM, Appelmelk BJ, Verboom T, Negrini R, Penner JL, Aspinall GO, et al. Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. J Clin Microbiol. 1996;34:2196–200.
71. Heneghan MA, McCarthy CF, Moran AP. Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. Infect Immun. 2000;68:937–41.
72. Monteiro MA, Zheng P, Ho B, Yokota S, Amano K, Pan Z, et al. Expression of histoblood group antigens by lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. Glycobiology. 2000;10:701–13.
73. Wirth HP, Yang M, Peek RM, Höök-Nikanne J, Fried M, Blaser MJ. Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same strain. J Lab Clin Med. 1999;133:488–500.
74. Park JS, Yeom JS, Seo JH, Lim JY, Park CH, Woo HO, et al. Immunohistochemical expressions of MUC2, MUC5AC, and MUC6 in normal, *Helicobacter pylori* infected and metaplastic gastric mucosa of children and adolescents. Helicobacter. 2015;201:1523–5378.
75. Niv Y, Boltin B, Halpern M, Cohen M, Levi Z, Vilkin A, et al. Membrane-bound mucins and mucin terminal glycans expression in idiopathic or *Helicobacter pylori,* NSAID associated peptic ulcers. World J Gastroenterol. 2014;20:14913–20.
76. Lindén SK, Wickström C, Lindell G, Gilshenan K, Carlstedt I. Four modes of adhesion are used during *Helicobacter pylori* binding to human mucins in the oral and gastric niches. Helicobacter. 2008;13:81–93.
77. Perrais M, Rousseaux C, Ducourouble MP, Courcol R, Vincent P, Jonckheere N, et al. *Helicobacter pylori* urease and flagellin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells. Gastric Cancer. 2014;17:235–46.
78. Navabi N, Johansson MEV, Raghavan S, Lindén SK. *Helicobacter pylori* infection impairs the mucin production rate and turnover in the murine gastric mucosa. Infect Immun. 2013;81:829–37.
79. Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2000;118:1072–9.
80. Rudnicka W, Czkwianianc E, Płaneta-Małecka I, Jurkiewicz M, Wiśniewska M, Cieslikowski T, Różalska B, Wadström T, Chmiela M. A potential double role of anti-Lewis X antibodies in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. FEMS Immunol Microbiol. 2001;30:121–5.
81. Skoog EC, Sjöling Ä, Navabi N, Holgersson J, Lundin SB, Lindén SK. Human gastric mucins differently regulate *Helicobacter pylori* proliferation, gene expression and interactions with host cells. PLoS One. 2012;7:e36378.
82. Magalhães A, Reis CA. *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. Braz J Med Biol Res. 2010;43:611–8.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

Errata

Gonciarz W, Krupa A, Hinc K, Obuchowsk M, Moran AP, Gajewski A, Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. *PLoSOne,* **2019**; 7:1, e0220636; DOI: 10.1371/journal.pone.0220636.

Błąd w druku dotyczy tytułów Rycin **10 i 11** zamieszczonych w publikacji:

- Strona 21: Rycina 10 "Total cell growth of gastric epithelial cells and fibroblasts exposed to *H. pylori* components". Tytuł dotyczy Ryciny 11 a nie Ryciny 10, znajdującej się na stronie 22
- Strona 22: Rycina 11 "The effectiveness of migration of gastric epithelial cells and fibroblasts exposed to *H. pylori* components". Tytuł dotyczy Ryciny 10 a nie Ryciny 11 znajdującej się na stronie 21

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts

Weronika Gonciarz[1], Agnieszka Krupa[1], Krzysztof Hinc[2], Michał Obuchowski[2], Anthony P Moran[3†], Adrian Gajewski[1], Magdalena Chmiela[1]*

1 Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Łodz, Poland, **2** Laboratory of Molecular Bacteriology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG-MUG, Medical University of Gdańsk, Gdansk, Poland, **3** Department of Microbiology, School of Natural Sciences, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland

† Deceased.
* magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Gonciarz W, Krupa A, Hinc K, Obuchowski M, Moran AP, Gajewski A, et al. (2019) The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLoS ONE 14(8): e0220636. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636

Editor: Arun Rishi, Wayne State University, UNITED STATES

Received: March 12, 2019

Accepted: July 19, 2019

Published: August 7, 2019

Copyright: © 2019 Gonciarz et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Helicobacter pylori colonizes the human gastric mucosa, causing chronic inflammation, peptic ulcers and gastric cancer. A cascade of harmful processes results from the interaction of these bacteria with the gastric epithelium.

Aim

To investigate these processes in terms of upregulation of oxidative stress and cell apoptosis and downregulation of the pro-regenerative activity of cells.

Methods

We employed an *in vivo* guinea pig model at 7 or 28 days postinoculation with *H. pylori*, corresponding to an acute or chronic stage of infection, respectively, and an *in vitro* model of guinea pig primary gastric epithelial cells and fibroblasts treated with bacterial components: glycine acid extract (GE), urease subunit A (UreA), cytotoxin-associated gene A protein (CagA) and lipopolysaccharide (LPS). Cells were evaluated for metabolic activity (MTT reduction), myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase (MMP-9) secretion, lipid peroxidation (4-hydroxynonenal (4HNE)), migration (wound healing), proliferation (Ki-67 antigen) and cell apoptosis (TUNEL assay; Bcl-xL, Bax, Bcl-2 expression; caspase 3 cleavage).

Results

Significant infiltration of the gastric mucosa by inflammatory cells *in vivo* in response to *H. pylori* was accompanied by oxidative stress and cell apoptosis, which were more intense 7 than 28 days after inoculation. The increase in cell proliferation was more intense in chronic

than acute infection. *H. pylori* components GE, CagA, UreA, and LPS upregulated oxidative stress and apoptosis. Only *H. pylori* LPS inhibited cell migration and proliferation, which was accompanied by the upregulation of MMP-9.

Conclusions

H. pylori infection induces cell apoptosis in conjunction with increased oxidative stress. Elevated apoptosis protects against deleterious inflammation and neoplasia; however, it reduces cell integrity. Upregulation of cell migration and proliferation in response to injury in the milieu of GE, CagA or UreA facilitates tissue regeneration but increases the risk of neoplasia. By comparison, downregulation of cell regeneration by *H. pylori* LPS may promote chronic inflammation.

Introduction

Gastric epithelial cells form a tight barrier that protects the stomach from the deleterious effects of microbial pathogens by maintaining polarity, adhesion, proliferation and movement [1]. Tight junctions are often a target for many bacterial pathogens, which can cause leaking of this barrier. Thus, the Gram-negative bacterium *Helicobacter pylori*, which colonizes more than 50% of the human population [2–3], disrupts the gastric barrier by the direct action of soluble bacterial components or by their interaction with epithelial cell receptors followed by stimulation of various endogenous signaling pathways [1]. *H. pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) protein, which is translocated to epithelial cells via the type IV secretion system, destabilizes the E-cadherin/β-catenin complex in a way that is independent of phosphorylation [4–5]. This leads to the activation of β-catenin, which induces the transformation of gastric epithelial cells [4]. CagA may also interfere with the polarization of the gastric epithelial cell membrane due to the interaction with the protease-activated receptor (PAR1)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which maintains cell polarization by phosphorylation of microtubule-associated proteins (MAP) [6–8]. During *H. pylori* infection, the transcription factors nuclear factor kappa B (NF-κB) and activator protein 1 (AP-1) are activated in response to gastric mucosa damage, followed by stimulation of immune cells to secrete proinflammatory mediators [9–10]. Various immunocompetent cells infiltrating the gastric mucosa, including neutrophils, monocytes, macrophages, T helper 1 lymphocytes (Th1), natural killer cells (NK) and nonimmune gastric epithelial cells, respond to *H. pylori*, and soluble compounds of this bacterium, such as urease subunit B (UreB) or outer membrane protein (Oip)A, by the secretion of cytokines and growth factors. They include interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)-α, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, macrophage migration inhibitory factor (MIF) and IL-23, which enable the differentiation and maturation of dendritic cells (DC) and diminish antigen presentation [9, 11–18]. *H. pylori* has developed several mechanisms to endure in the organism. The ability of *H. pylori* to survive within phagocytes can be mediated by the bacterial production of catalase [19–2]. Other *H. pylori* virulence factors, such as lipopolysaccharide (LPS) and vacuolating cytotoxin (VacA), encoded outside the CagA pathogenicity island (PAI), can cause apoptosis of phagocytes and downregulation of NK cell cytotoxic activity [20–23]. Furthermore, stimulation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3)-dependent pathway in DC through CagA or interaction of dendritic cell-specific adhesion molecule -3 –grabbing nonintegrin (DC-SIGN) with Lewis (Le) sugar determinants

in *H. pylori* LPS results in the production of anti-inflammatory IL-10 and transforming growth factor (TGF)-®, thus promoting maturation of regulatory T lymphocytes (Treg) that are responsible for silencing the immune response [24–31].

The pathogenesis of *H. pylori* infections is associated first with acute and second with chronic inflammatory responses. The infection may result in gastric/duodenal ulcers or gastric cancer development. Excessive inflammation induced by *H. pylori* can impair the gastric epithelial barrier and its protective function [32]. Impairment of this function can facilitate the translocation of *H. pylori* virulence factors and inflammatory mediators into the circulation, causing the development of a systemic inflammatory response. The mechanisms involved in *H. pylori*–related deleterious effects are not fully understood. Potentially, the interactions of bacteria and their soluble components with the gastric barrier can induce pathological processes. However, it is not clear how various soluble *H. pylori* components, whose content can change during infection, affect the homeostasis of the gastric barrier. Moreover, it is interesting whether endogenous host factors such as matrix metalloproteinase (MMP)-9, released by proinflammatory cells and potentially by gastric epithelial cells, can influence this process. This protein stimulates cell apoptosis and is involved in the process of cell proliferation.

In this study, we used an *in vivo* model of experimental *H. pylori* infection in guinea pigs (*Caviae porcellus*) to show whether there is a correlation between acute (7 days after inoculation) or chronic infection (28 days after inoculation) and inflammation in the gastric mucosa of infected *vs* uninfected animals. Additionally, we analyzed the possible correlation between determinants of oxidative stress, such as myeloperoxidase (MPO), which is released during *H. pylori* infection, or 4-hydroxynonenal (HNE), which is a product of lipid peroxidation, and the induction and progression of cell apoptosis, cell migration, and proliferation, which would reflect a pro-regenerative potential of the cells. In our previous study (unpublished data), we showed a correlation between the increased serum concentration of MMP-9 and *H. pylori* infection in adult patients with gastritis or coronary heart disease. MMP-9 is a confirmed pro-apoptotic factor and regulator of the cell cycle; therefore, this metalloproteinase was selected for study. Furthermore, we used *in vitro* cellular models of guinea pig primary gastric epithelial cells and fibroblasts to evaluate whether the *H. pylori* soluble compounds glycine acid extract (GE), a complex of cell surface antigens; the UreA subunit of urease; CagA; and LPS modulate cell proliferation and apoptosis. The use of recombinant proteins is an artificial approach, since it is unclear whether the different components tested will have an effect similar to live bacteria. Therefore, the results should be interpreted cautiously. *H. pylori* causes an island-like infection, so their components can be released into the gastric environment during bacterial cell lysis and then deposited locally in an increased concentration. Therefore, *in vitro* experiments can help to examine the effect of individual bacterial components.

Materials and methods

H. pylori strains and culture conditions

Helicobacter pylori reference strain CCUG 17874 (Culture collection, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden), positive for VacA and CagA, was used in this study. *H. pylori* bacteria were stored at -80˚C in trypticase soy broth (TSB) containing 10% glycerol. Bacteria were cultured under microaerophilic conditions according to a previously described procedure [33].

H. pylori stimulators

Glycine acid extract (GE) was purified from the reference *H. pylori* strain CCUG 17874 according to previously described methods [34–36] and contained surface antigens of *H.*

pylori. The LPS concentration in the GE sample was <0.001 EU/ml, as shown by the chromogenic *Limulus amebocyte* lysate test (Lonza, Braine-Alleud, Belgium). It was used for *in vitro* experiments at a concentration of 10 μg/ml.

Recombinant CagA protein (rCagA) was expressed in *E. coli* as a fusion protein as previously described [37–38]. CagA protein was a kind gift from Antonello Covacci, IRIS, Siena, Italy), and it was used for *in vitro* experiments at a concentration of 1 μg/ml.

Due to patent claims, the ureA subunit of urease from *H. acinonychis* was isolated from the acidic environment of the cheetah stomach and used as a homolog of *H. pylori* UreA protein (97% homology). The urease gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) as previously described [39]. UreA was used for *in vitro* experiments at a concentration of 5 μg/ml.

LPS from the reference *H. pylori* CCUG 17874 strain was obtained by hot phenol-water extraction and purified by proteinase K, DNase and RNase treatment as previously described [40–41]. *H. pylori* LPS and standard *E. coli* LPS (serotype O55:B5, Sigma-Aldrich) were used for *in vitro* experiments at a concentration of 25 ng/ml. The antigen concentrations were adjusted experimentally or adopted from previously performed experiments [20, 42–43].

H. pylori infection in guinea pigs

Adult (three-month-old), 400–600 g, germ-free male Himalayan guinea pigs were used in the experiments. The animals had been bred in the Animal House at the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz (Poland), kept in cages with free access to drinking water and fed with standard chow. All animal experiments were carried out according to the EU directive and approved by the Local Ethics Committee (LKE9) for Animal Experiments, Medical University of Lódź, Poland, which was established by the Ministry of Science and Higher Education in Poland (Decision 58/ŁB45/2016). The animals were inoculated *per os* with *H. pylori* as previously described [33, 42]. During the course of infection until day 7 or 28 after inoculation, animal health was monitored every day based on the following criteria: body weight, water and food intake, behavioral symptoms, skin and fur condition, and diarrhea. Seven or 28 days after the last *H. pylori* inoculation, the animals were euthanized by overdosing sodium barbiturate, which was administered intraperitoneally, and gastric tissue was collected for histopathological analysis. Blood samples were processed to obtain serum and then stored at –80˚C. *H. pylori* infection was confirmed by histopathological staining to visualize *Helicobacter*-like organisms (HLO) and gastric tissue inflammation as well as by polymerase chain reaction (PCR) to detect *cagA* and *ureC* gene sequences according to previously described procedures [33, 42]. Additionally, anti-*H. pylori* IgG antibodies in the serum samples were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) developed in the laboratory, as previously described [36]. The level of *H. pylori* antigens in the stool samples of infected animals was evaluated by commercial ELISA (Immunodiagnostic AG, Bensheim, Germany). In total, 15 animals were used in the study, 5 of which were always controls (noninoculated animals). The remaining 10 animals were infected with *H. pylori*, 5 animals per group (n = 5+5). The animals were examined 7 or 28 days after inoculation.

Preparation of guinea pig gastric tissue for histological and immunohistochemical examination

Gastric tissue was isolated from noninfected animals and infected animals on the 7^{th} or 28^{th} day of infection and processed for histological and immunohistochemical/fluorescence examination as described in detail previously [33, 44]. For histological examination of the inflammatory response and *H. pylori* colonization, gastric tissue sections were stained routinely with hematoxylin and eosin. For immunohistochemical/fluorescence analysis, they were stained

with selected primary and secondary antibodies (specified below). Cell nuclei were counter-stained with 4′,6-diamidine-2-phenylindole (DAPI) as previously described [45]. Histopathological and immunohistochemical imaging was done under a light microscope (YS100 Nikon, Tokyo, Japan), a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1, Oberkochen, Germany) or confocal microscope (Leica TCS SP, Germany) at a wavelength for FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm) or DAPI (358 nm excitation, 461 nm emission) at adjusted magnification [46]. The intensity of fluorescence was measured using ImageJ software version 1.48v (National Institutes of Health, United States). The infiltration of the gastric tissue with granulocytes was evaluated by immunohistochemical staining using the primary rabbit anti-mouse 1A8-Ly-6G antibody conjugated to FITC (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), diluted in 1% BSA/PBS 1:50. The infiltration of the gastric tissue with $CD4^+$ or $CD8^+$ T lymphocytes was evaluated by staining with mouse anti-pig CD4 or CD8 antibodies (Diaclone, Besancon cedex, France) diluted 1:100 in 1% BSA/PBS, followed by incubation with goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, Great Britain) diluted in 1% BSA/PBS 1:50. Inflammation was categorized as active on the basis of granulocytes or as chronic on the basis of lymphocyte infiltration. It was graded 0 when no or few inflammatory cells were detected; 1 (mild) when up to 40 cells were detected; 2 (moderate) when up to 60 cells were detected, and 3 (strong) when up to 80 cells were detected. The level of gastric tissue cell proliferation was estimated by immunohistochemical staining of Ki-67 cell cycle antigen with monoclonal anti-Ki-67 antibody (MIB-1 clone, diluted 1:150 in 1% BSA/PBS, Dako, Glostrup, Denmark) and is expressed as a proliferation/labeling index (LI%), reflecting the proportion of Ki-67-positive *vs* -negative epithelial cells, as previously described [33]. For histological examination, the same stomach regions were always imaged in the three experimental groups. The number of stained cells was normalized per high-power field.

Cell cultures for immunohistochemical examination

Guinea pig primary gastric epithelial cells were prepared according to previously described procedures [44, 47–49].

Guinea pig fibroblasts (CRL-1405) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Manassas, USA) and cultured in complete RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) plus 1% penicillin/streptomycin at 37˚C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. The cells were passaged every seven days with 0.25% trypsin/0.02% N,N,N′,N′-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and used for experiments at a concentration of $1{\cdot}10^5$ cells/ml or $1{\cdot}10^6$ cells/ml. For immunohistochemical and immunofluorescent staining, both types of cells were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 0.02% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) in phosphate-buffered saline (PBS). Uncovered space on a glass carrier was blocked by 1 h incubation in 5% bovine serum albumin (BSA)/PBS at room temperature. The cells were then incubated overnight at 4˚C with selected primary and secondary antibodies (specified above). The cell nuclei were stained with Hoechst dye (AAT Bioques, Sunnyvale, USA) diluted 1:1000 in PBS or with DAPI (Sigma-Aldrich) (2.5 μg/ml) for 15 min at room temperature. The intensity of fluorescence was measured with a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1) at the appropriate wavelengths for FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm) and Hoechst/DAPI (358 nm excitation, 461 nm emission) at 200 magnification [46] or measured using a Victor2 multifunctional reader (Wallak, Oy, Turku, Finland). Data analysis was done using ImageJ software version 1.48v. Four independent experiments were carried out with three replicates of each variant. Cells were imaged under a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1, Oberkochen, Germany) or a confocal microscope (Leica TCS SP)

Cell metabolic activity and proliferation

Primary gastric epithelial cells and fibroblasts were placed in 96-well plates at a concentration of 1×10^6 cells/well in a volume of 100 ∝l/well and then cultured until adherence, followed by 24 h stimulation with *H. pylori* components and estimation of metabolic activity and proliferation. The metabolic activity of cells nonstimulated or stimulated with *H. pylori* components for 24 h was evaluated with a colorimetric MTT reduction assay based on converting the tetrazolium yellow dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml; Sigma- Aldrich) by living cells to purple formazan crystals, as previously described [45]. Cell proliferation was detected with a radioactive assay based on the incorporation of tritiated thymidine (^{3}H) TdR into cell DNA, as previously described [45], and is expressed as a stimulation index (SI), which shows the relative counts per minute (cpm) ratio, calculated by dividing the cpm for the cells cultivated in culture medium with a stimulator by the cpm for the cells cultured in medium alone. An SI value equal to 1.5 (*cutoff*) or higher was considered a positive result in the proliferation assay. The results from four independent experiments performed in triplicate for each variant of stimulation are shown. Cells were imaged under a light microscope (YS100 Nikon, Tokyo, Japan).

Migration assays

The migration of both primary guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts was evaluated in a "scratch test" based on the ability of cells to move into a space created by an *in vitro* scratch wound, as previously described [45]. The ability of the cells to heal the wound in response to *H. pylori* antigens is expressed as a percentage of cells migrating to the wound zone *vs* the migration of untreated cells. Four independent experiments were carried out in triplicate for each variant of stimulation. Cells were imaged under a light microscope (YS100 Nikon, Tokyo, Japan).

Determinants of oxidative stress

Myeloperoxidase was detected in gastric tissue homogenates. Briefly, 75 ∝l/well of gastric tissue homogenate was mixed on the plate with 150 ∝l/well of 3,3'5,5'tetrametylobenzydyne (TMB) (20 mM TMB/DMSO in 12.5 ml NaH_2PO_4 270 ∝l/well buffer pH 5.4 with 3 ∝l of 30% H_2O_2). After 10 min incubation, at room temperature, 50 ∝l of 1 M H_2SO_4 was added to stop the color reaction. Absorbance was read using a Victor 2 reader at a wavelength of 450 nm.

The level of 4HNE as a lipid peroxidation product was evaluated both in cell cultures and tissue specimens. First, tissue specimens (after paraffin removal) and cells cultured in a 96-well plate were subjected to antigen unmasking. After blocking unspecific binding with 5% goat serum in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h, the cells and tissue specimens were incubated overnight at 4˚C with primary rabbit polyclonal anti-4HNE antibody (Bios, Woburn, Massachusetts, USA) diluted 1:100 (tissue staining) or 1:500 in 1% BSA/PBS (cell staining), followed by incubation with FITC-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (Invitrogen Carlsbad, California, USA) diluted in 1% BSA/PBS 1:200 (tissue staining) or 1:2000 (cell staining). The nuclei were stained with DAPI. The intensity of fluorescence of 4HNE in gastric epithelial cells was estimated using a Victor2 reader at the wavelengths for FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm), whereas in tissue samples, the intensity of fluorescence was examined using a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1) or a confocal microscope (Leica TCS SP) at the wavelengths for FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm) and for DAPI (358 nm excitation, 461 nm emission), at adjusted magnification (specified in each figure) [46]. Four independent experiments were carried out in triplicate for each sample tested.

ELISA for MMP-9

The concentration of total MMP-9 in guinea pig serum samples, gastric tissue homogenates and culture media of primary gastric epithelial cells and fibroblasts stimulated with *H. pylori* components for 24 h was measured by an ELISA (MyBiosource, San Diego, CA, USA) with a sensitivity of 0.1 ng/ml as instructed by the manufacturer. Absorbance was estimated using a Victor2 reader at a wavelength of 450 nm. Four independent experiments were carried out in triplicate for each stimulation variant.

Cell apoptosis

The intensity of apoptosis in guinea pig primary gastric epithelial cells and fibroblasts as well as gastric tissue was evaluated using the TUNEL assay (Cell Meter TUNEL Apoptosis Assay Kit, AAT Bioques, Sunnyvale, USA). Cell nuclei were counterstained with Hoechst diluted 1:1000 in PBS for 15 min at room temperature. Cells with apoptotic changes were visualized as red in a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1) or in a confocal microscope (Leica TCS SP) at 550 nm excitation and 590 nm emission, at magnification adjusted for the cells or for the gastric tissue (specified in each figure). Four independent experiments were carried out in triplicate for each experimental variant.

To detect the involvement of anti- and proapoptotic proteins in the apoptosis process, gastric epithelial cells and fibroblasts, stimulated previously with *H. pylori* antigens for 24 h, gastric tissue specimens from control animals or those infected with *H. pylori* were incubated with rabbit monoclonal anti-B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), anti-Bcl-2-like protein 4 (Bax) antibody (Abbkine, Waltham, MA, UAS), anti-B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) antibody (Abbkine, Waltham) or anti-caspase 3 (Cell Signaling Technology, USA) antibody diluted 1:100 or 1:500 in 1% BSA/PBS for tissue or cell staining, respectively. The gastric tissue or primary cells were then treated with the appropriate secondary antibody: FITC-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen Carlsbad, California, USA) diluted 1:2000 in 1% BSA/PBS for the primary cell staining and goat anti-rabbit Alexa Fluor 568-IgG secondary antibody (Invitrogen, USA) diluted 1:200 for tissue staining. Cell nuclei were stained with DAPI. The intensity of fluorescence was detected using a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1) or a confocal microscope (LeicaTCS SP) at the appropriate wavelengths for FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm), for Alexa Fluor 568 (excitation 591 nm, emission 608 nm), and for DAPI (358 nm excitation, 461 nm emission), at magnification adjusted for the cells and for the gastric tissue (specified in each figure). The data were analyzed with ImageJ software version 1.48v. Four independent experiments were carried out in triplicate for each experimental variant.

Statistical analysis

All values are expressed as the median values with a range. The statistical significance in individual experiments was tested using Statistica 12 PL software with the nonparametric Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. Results were considered statistically significant when: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Results and discussion

During *H. pylori* infection in humans, bacteria adhere to gastric epithelial cells, causing gastric epithelial barrier destabilization, which leads to the development of an inflammatory reaction associated with infiltration of immunocompetent cells in response to IL-6, IL-8 and potentially IL-33 [50–51]. The use of an experimental model of *H. pylori* infection in guinea pigs allows us

to study a typical outcome of *H. pylori* infection [52–53], mostly because guinea pigs are the only laboratory animals with a stomach structure resembling the structure of the human organ. Moreover, guinea pigs are prone to developing inflammation in response to the secretion of IL-8, IL-6 and IL-33 by gastric epithelial and immunocompetent cells [42, 53–54]. In our study, we employed an *in vivo* model of guinea pig experimental *H. pylori* infection and *in vitro* cellular models of guinea pig primary gastric epithelial cells and fibroblasts treated with *H. pylori* or its soluble components to evaluate the effect of *H. pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts, as well as the mobility and pro-regenerative potential of these cells.

Animal study–response to experimental *H. pylori* infection

In our model, the status of *H. pylori* infection after 7 and 28 days of inoculation was confirmed by histological, molecular and serological methods, as previously described [33]. For histological analysis, we applied several principles of the Sydney system, a classification of gastritis introduced in 1990 and updated in 1995 [55]. The gastric mucosa of guinea pigs inoculated with *H. pylori* was colonized with these bacteria, as shown by Giemsa and Warthin-Starry tissue staining, which were used for visualization of HLO (**Fig 1A**). In the gastric tissue of infected but not control animals, *cagA* and *ureC* sequences were detected by PCR as a 294-base-pair (bp) product and a 298 bp product, respectively (**Fig 1B**). In a previous study, in the same species, we showed that infection of guinea pigs with *H. pylori* was followed by upregulation of mucin 5 (MUC5AC) expression and deposition of Lewis determinants in the gastric mucosa, particularly 7 days after inoculation, which were correlated with enhanced gastric tissue colonization by the bacteria [44]. The infected animals responded to the bacteria by producing anti-*H. pylori* IgM and IgG. The level of anti-*H. pylori* IgM in serum samples of animals was higher at 7 than at 28 days after inoculation, indicating an acute infection, whereas the animals 28 days after inoculation showed a higher level of anti-*H. pylori* IgG than those 7 days after inoculation (**Fig 1C i, ii**). Similarly, the concentration of *H. pylori* antigens in animal stool samples was higher at 28 than at 7 days after inoculation, which confirmed the persistence of infection (**Fig 1C iii**). Histopathological analysis of gastric tissue sections stained with hematoxylin and eosin showed inflammation within the gastric tissue in the *H. pylori*-infected animals (**Fig 2A i**). The infection was accompanied by a significant infiltration of granulocytes (Ly-6G positive cells) within 7–28 days after inoculation, which was stronger after 28 days (grade 3) than after 7 days (grade 2) (**Fig 2B i, ii**). The inflammatory response became chronic 28 days after inoculation, as evidenced by the infiltration of lymphocytes, which were located mainly in the submucosa (grade 3) (**Fig 2A i**). However, 7 days after inoculation, a higher number of CD4+ T cells than CD8+ T lymphocytes was detected, whereas 28 days after inoculation, the number of CD8+ T lymphocytes was higher than that of CD4+ T cells (**Fig 2C i, ii and Fig 2D i, ii, respectively**). These results indicate the engagement of various T lymphocyte subpopulations during the course of infection. Previously, in *vitro* cell cultures carried out with lymphocytes from mesenteric lymph nodes of *H. pylori*-infected guinea pigs in the presence of a soluble *H. pylori* antigenic complex, the lymphocytes, particularly CD4-positive T cells, proliferated intensively, indicating the domination of this lymphocyte population in the infected guinea pigs four weeks postinfection [42]. In the same study, we analyzed mRNA levels for monocyte-derived cytokines, such as interleukin (IL)-8, IL-1α and interferon gamma (IFN-γ), and for lymphocyte-derived cytokines, including transforming growth factor beta (TGF-β), in leukocyte cell cultures derived from mesenteric lymph nodes of control and *H. pylori*-infected guinea pigs [42]. In the monocytes of both uninfected and infected animals, IL-8 mRNA was detected, whereas mRNA for IL-1β was shown only in the monocytes of

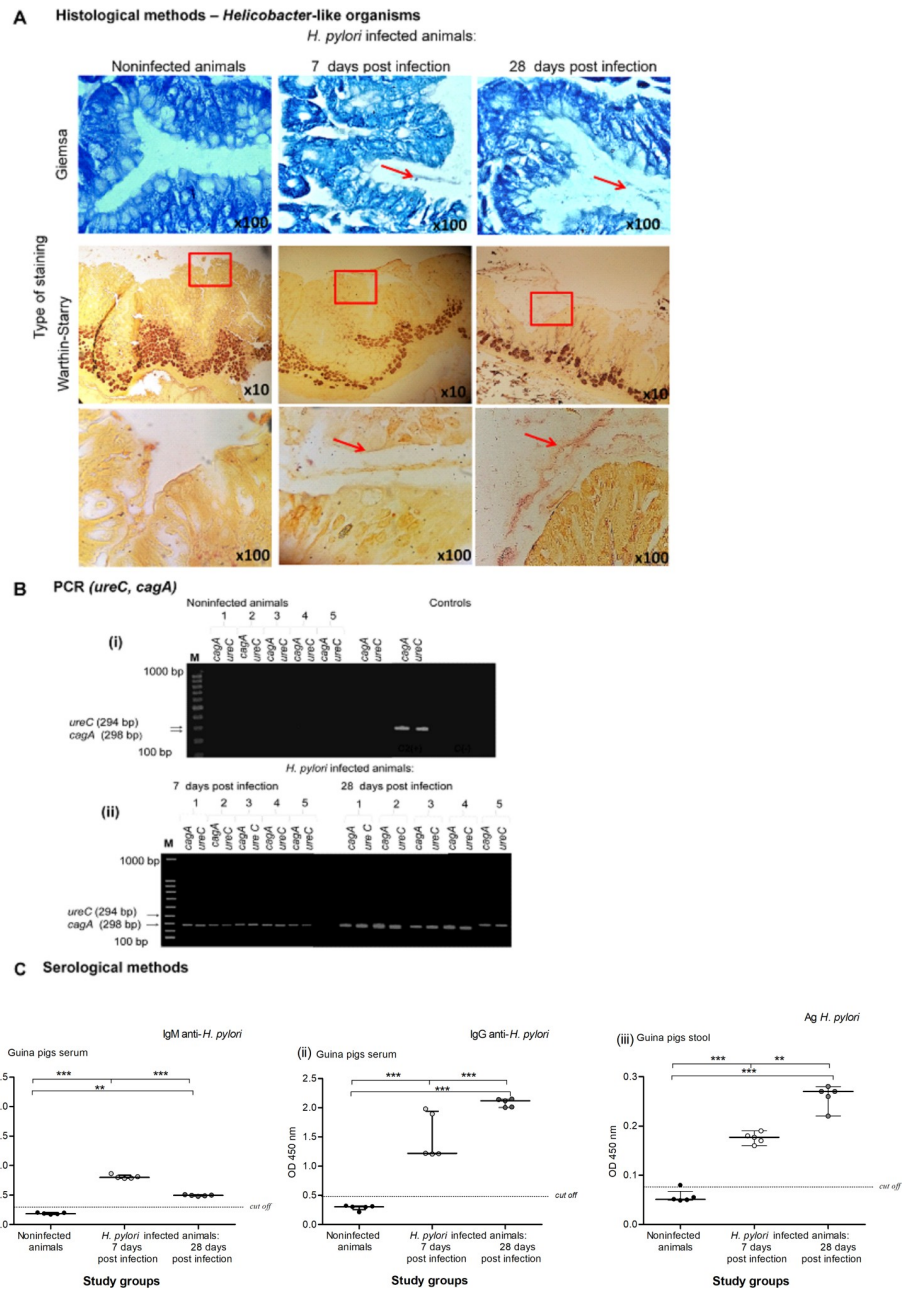


Fig 1. Histological, serological and molecular assessment of *H. pylori* infection in an experimental guinea pig model. (A) Representative images of gastric tissue sections collected from guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation, stained with Giemsa and Warthin-Starry method and visualized in a light microscope (YS100, Nikon, Japan). Red arrows and squares indicate the location of *Helicobacter*-like organisms (HLO). **(B)** The electrophoretic separation of the *ureC* and *cagA H. pylori* gene amplification products by polymerase chain reaction (PCR) of gastric tissue samples isolated from noninfected or *H. pylori* infected guinea pigs after 7 days from inoculation. Samples were run in 1.4% agarose gel in the presence of marker size (M) 100bp and controls: (C [+]—positive control—*H. pylori* DNA isolated from *H. pylori* suspension at the density $1x10^8$ CFU/ml, C [–]—negative control, reaction mixture lacking DNA). (**i**) Lack of amplification products for *cagA* and *ureC* genes in the gastric tissue samples isolated from control animals. (**ii**) Presence of DNA (amplification products) for CagA (the *cagA* gene—298 bp) and UreC (the *ureC* gene amplification—294 bp) in the gastric tissue samples isolated from animals infected with *H. pylori*. **(C)** Serological methods for detection of the serum level of anti-*H. pylori* IgM (**i**), anti-*H. pylori* IgG (**ii**) and *H. pylori* antigens (**iii**) in stool samples collected from guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. Five animals per group for control and, 5 per group for infected animals (7 and 28 days after inoculation, 5+5) were examined. The results are presented as median values of four independent experiments

performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical significance $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ was obtained for *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation) *vs* control animals; *H. pylori* infected animals 7 days *vs* animals 28 days from the last inoculation.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g001

uninfected animals. TGF-β mRNA was detected in the lymphocytes of control and *H. pylori*-infected guinea pigs. Interestingly, a significantly increased level of mRNA for IFN-γ was detected in the lymphocytes from *H. pylori* infected compared to noninfected animals and was propagated in the cell cultures only in response to *H. pylori* antigens but not in the cell culture medium alone [42]. These results were compatible with the study of Kronsteiner et al. [56], which revealed that *H. pylori* infection in guinea pigs induced a predominant systemic response characterized by an increased number of T CD4-positive lymphocytes. Our preliminary results in guinea pigs 60 days after inoculation with *H. pylori* confirmed the maintenance of the chronic inflammatory response (unpublished data). The gastric tissue of uninfected animals showed no evidence of increased inflammation **(Fig 2).** Our observations from the present study on the development of an inflammatory process in response to *H. pylori* infection are in line with the results obtained by other groups who have studied the development of an inflammatory response in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected guinea pigs [33, 57–58]. Sjoredn et al. [59] revealed a massive infiltration of mononuclear cells and eosinophils in the gastric mucosa of guinea pigs 3 weeks after inoculation with *H. pylori*. Sun et al. [60] showed *H. pylori*–induced gastritis in Mongolian gerbils, which was associated with gastric barrier defects extending from the antrum into the corpus over time.

Importantly, oxidative stress induced by *H. pylori* components or endogenous factors may contribute to pathophysiologic and histopathological alterations, including autophagy and apoptosis, leading to gastritis and even cancer development [61]. In our study, the *H. pylori*-induced inflammatory reaction in the gastric mucosa of infected animals was associated with an increase in oxidative stress, more significantly 7 days than 28 days after inoculation, which we evaluated by monitoring lipid peroxidation in the gastric tissue (4HNE detection) **(Fig 3A)** and MPO concentration **(Fig 3B).** The highest level of 4HNE was observed in animals infected with *H. pylori* 7 days after inoculation and remained at an elevated level after 28 days, although it was lower than at 7 days after inoculation. This may suggest an initiation of the antioxidative host response. An increased concentration of MPO was detected in the gastric tissue of infected animals. It was higher at 28 than 7 days after inoculation, which was in line with the increasing number of granulocytes in the gastric epithelium during the course of infection.

Due to the infiltration of the gastric mucosa by neutrophils during *H. pylori* infection, we evaluated the local and systemic concentrations of MMP-9 **(Fig 3C).** This matrix metalloproteinase is delivered mainly by activated granulocytes, whose enzymatic activity and secretion of reactive oxygen species intensify oxidative stress in the inflammatory milieu, and by epithelial and endothelial cells in response to various stimuli [62–63]. In our previous study (unpublished data), we showed a correlation between the increased serum concentration of MMP-9 and *H. pylori* infection in adult patients with gastritis or coronary heart disease. In this study, the concentration of MMP-9 was evaluated in the gastric tissue homogenates or in the serum of *H. pylori*-infected or uninfected guinea pigs **(Fig 3C i, ii).** It was significantly higher in the gastric tissue of infected animals 7 days after inoculation than in uninfected animals and increased further 28 days after inoculation. On the other hand, the level of MMP-9 in the serum of infected animals significantly increased at 28 days, whereas at 7 days, it stayed at the level of control (uninfected animals) **(Fig 3C ii).** Our results suggest that the level of MMP-9 increased first locally and then systemically. MMP-9 catalyzes the normal turnover of

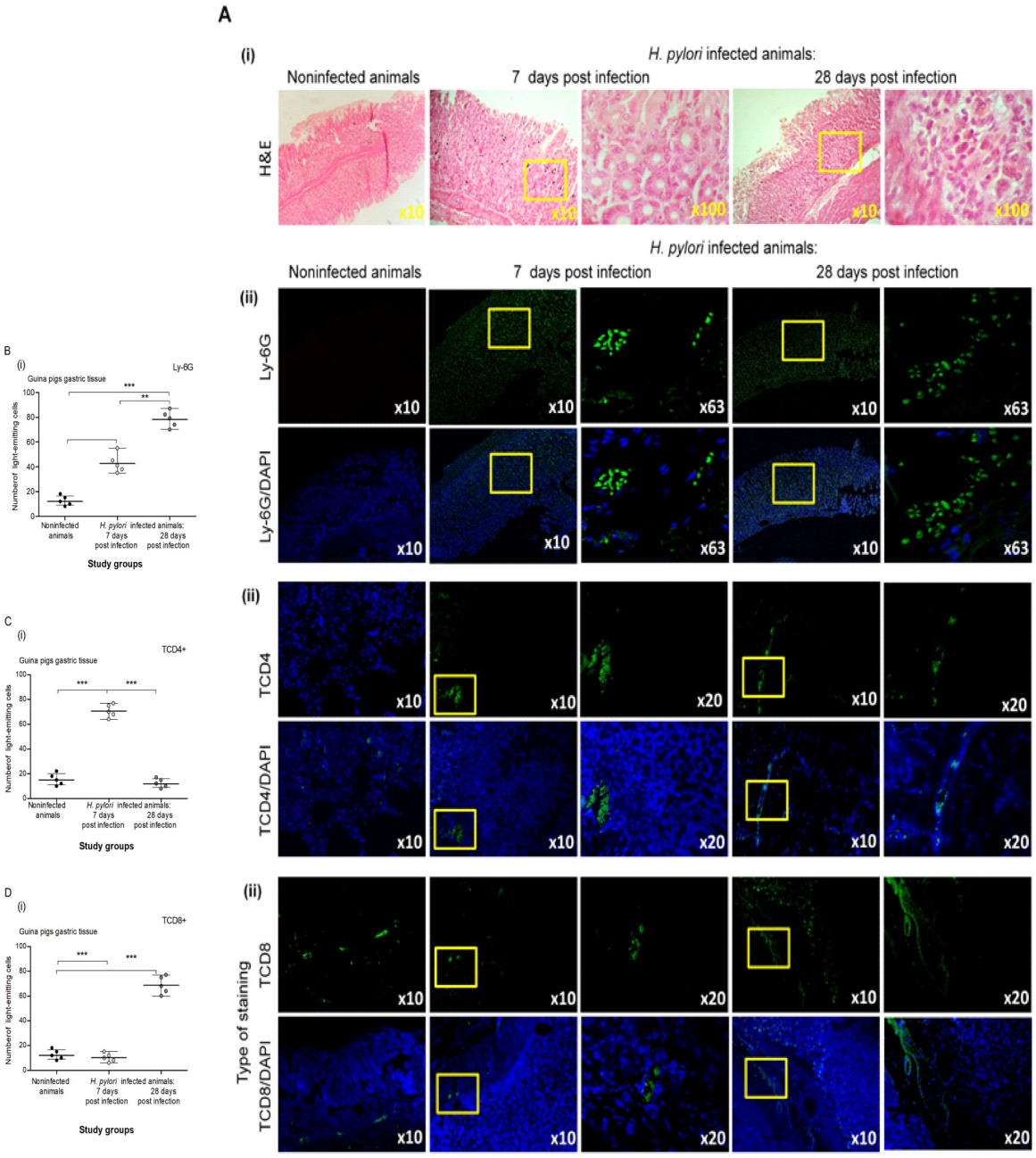


Fig 2. Infiltration of guinea pig gastric mucosa with inflammatory cells in response to *H. pylori* infection. (A) Representative images of haematoxilin and eosin (H&E) staining of the gastric tissue of guinea pigs noninfected (n = 5) or infected experimentally with *H. pylori* after 7 days (n = 5) and 28 days from inoculation (n = 5) photographed in light microscope (YS100 Nikon, Japan). Yellow squares show inflammatory cells infiltration. **(B)** Representative images of neutrophils (Ly-6G marker, FITC—green) in the gastric tissue of noninfected (n = 5) and *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation, n = 5+5). The cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Tissue sections were photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP) at wavelengths: FITC 495 nm excitation and 519 nm emission; DAPI 345 nm excitation and 455 nm emission. **(C)** Representative images of CD4+ lymphocytes (FITC—green) in the gastric tissue of noninfected (n = 5) and *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation, n = 5+5). The cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Tissue sections were photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP) at wavelengths: FITC 495 nm excitation and 519 nm emission; DAPI 345 nm excitation and 455 nm emission. **(D)** Representative images of CD8+ lymphocytes (FITC—green) in the gastric tissue of noninfected (n = 5) and *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation, n = 5+5). The cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Tissue sections were photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP) at wavelengths: FITC 495 nm excitation and 519 nm emission; DAPI 345 nm excitation and 455 nm emission. **(i)** The intensity of fluorescence of Ly6G, CD4+ and CD8+ positive cells in gastric tissue of noninfected (n = 5) and *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation, n = 5+5) measured in the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). The results

are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical significance $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ was obtained for *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation) *vs* control animals; *H. pylori* infected animals 7 days *vs* animals 28 days from the last inoculation.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g002

extracellular matrix (ECM) macromolecules and can play an important role in repair processes. It is also a confirmed proapoptotic factor and regulator of the cell cycle [64].

In humans, *H. pylori* infection can modify epithelial cell morphology, causing disruption of tight junctions, induction of cytokine production, epithelial cell proliferation, and an increase in epithelial cell death via apoptosis [65–66]. In our study, we employed the TUNEL assay to show the rate of apoptosis within the gastric mucosa of the studied animals. Our results indicated an increased number of cells undergoing apoptosis in the gastric mucosa of guinea pigs infected with *H. pylori* in comparison to noninfected animals. More apoptotic cells were found in the gastric tissue of infected animals after 7 days than after 28 days of infection **(Fig 4A i, ii),** which was compatible with an increased expression of anti-apoptotic Bcl-xL protein in the gastric tissue at 28 days **(Fig 4B i, ii)**. Our observation of cell apoptosis in the TUNEL assay was further confirmed by the detection of an elevated level of cleaved pro-apoptotic caspase 3, which was more pronounced after 7 than after 28 days **(Fig 4C i, ii)**. The severity of apoptotic changes in the gastric tissue may be a response to strong inflammation, especially during an

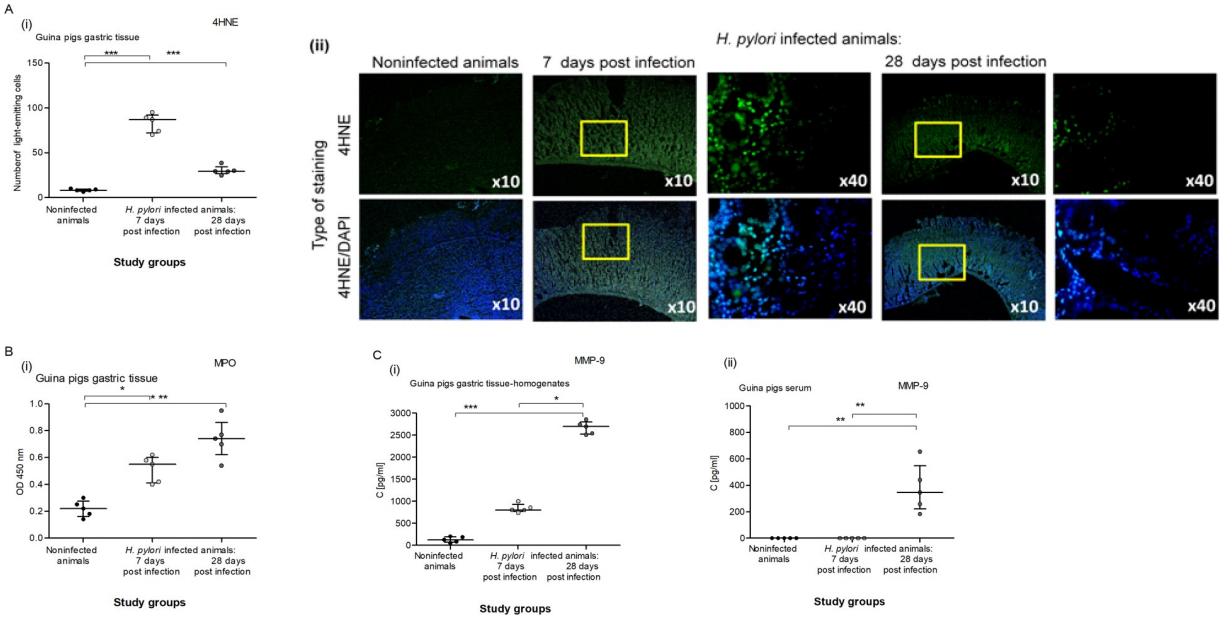


Fig 3. Detection of 4HNE, MPO and MMP-9 in the gastric tissue of *H. pylori* infected guinea pigs. **(A)** Oxidative stress assessment in the gastric tissue of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation based on the presence of 4-hydroxynonenal (4HNE). **(i)** Fluorescence intensity of 4HNE in the gastric tissue measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). **(ii)** Representative images of 4HNE in the gastric tissue visualized in a confocal microscope (LeicaTCS SP) at wavelengths: FITC 495 nm excitation and 519 nm emission; DAPI 345 nm excitation and 455 nm emission. **(B)** Level of myeloperoxidase (MPO) in the gastric tissue homogenates of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. **(C)** Level of metalloproteinase (MMP-9) in gastric tissue homogenates **(i)** or serum **(ii)** of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. Five animals per group for control and, 5 animals per group for infected individuals (7 and 28 days after inoculation, n = 5+5) were examined. The results are presented as median values with a range of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical significance $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ was obtained for *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation) *vs* control animals; *H. pylori* infected animals 7 days *vs* animals 28 days from the last inoculation.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g003

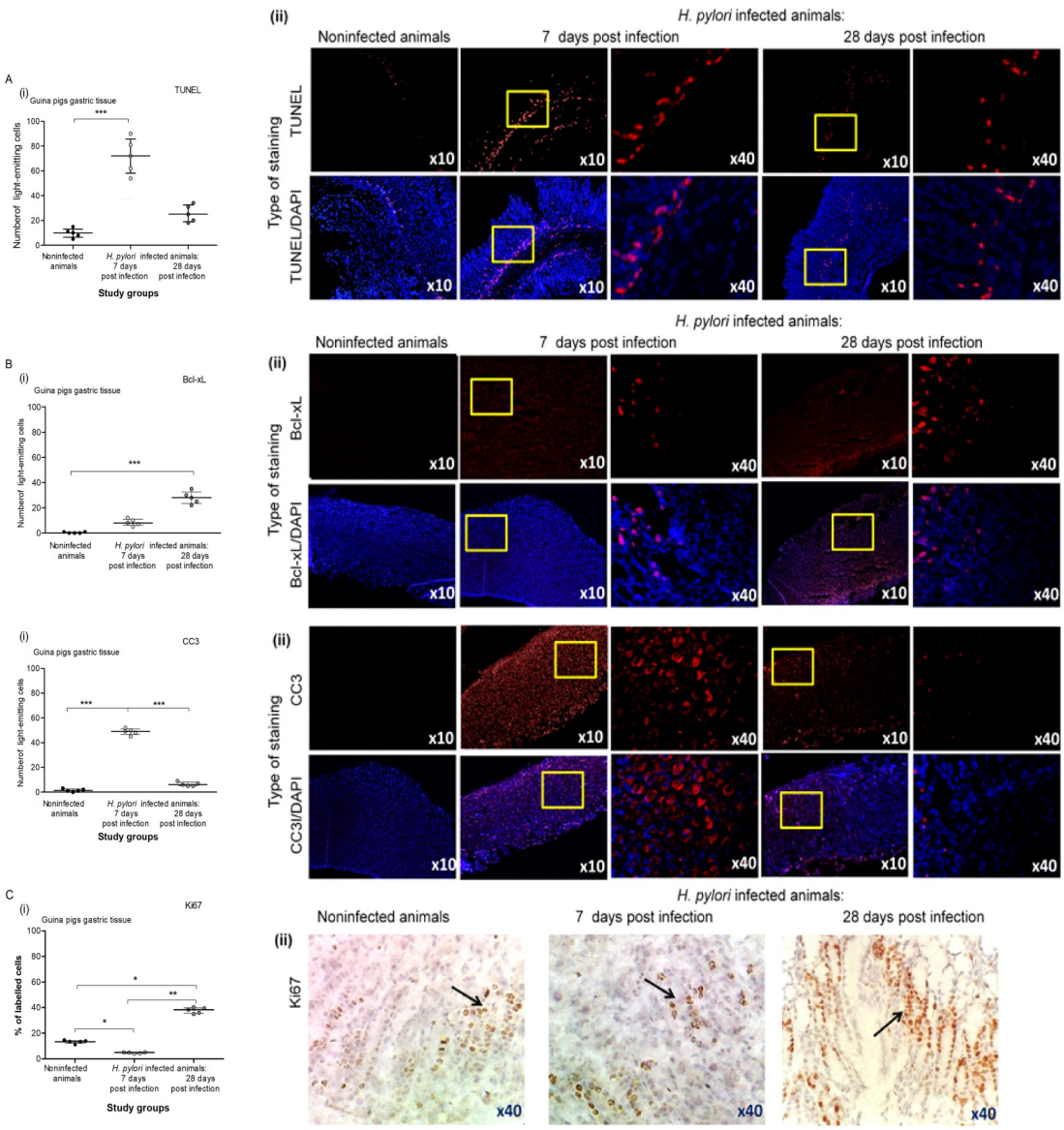


Fig 4. The intensity of apoptosis and proliferation in the gastric tissue of guinea pigs infected with *H. pylori*. **(A)** Level of apoptosis was evaluated in the gastric tissue of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. **(i)** Fluorescence intensity of apoptotic cells, detected in the gastric tissue using the TUNEL assay and counterstained with DAPI was measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). **(ii)** Representative images of gastric tissue sections stained with the TUNEL assay, counterstained with DAPI and photographed in a fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany) at wavelengths: 550 nm (excitation) and 590 nm (emission) for TUNEL and 345 nm (excitation) 455 nm (emission) for DAPI. **(B)** Level of intensity of anti-apoptotic Bcl-xL in the gastric tissue of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. **(i)** Fluorescence intensity of Bcl-xL in the gastric tissue was measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). **(ii)** Representative images of Bcl-xL in the gastric tissue photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP). DAPI was used for nuclear staining. **(C)** Level of intensity of cleaved pro-apoptotic caspase 3 (CC3) in the gastric tissue of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. **(i)** The fluorescence intensity of CC3 in the gastric tissue was measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). **(ii)** Representative images of CC3 in the gastric tissue photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP). DAPI was used for nuclear staining. **(D)** Level of Ki-67 (proliferation marker) in the gastric tissue of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori* after 7 and 28 days from inoculation. **(i)** Cell proliferation expressed as a labelling index (LI %), indicating the proportion of Ki-67 positive cells (brown labelled-cells) to all epithelial cells, counted using the Image J software program. **(ii)** Representative images of gastric tissue stained for the Ki67. Black arrows show Ki-67 positive cells. Five animals per group for control and, 10 animals per group for infected individuals (n = 5+5) were examined. The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in the nonparametric U Mann-Whitney

and Kruskal-Wallis tests. Statistical significance $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ was obtained for *H. pylori* infected animals (7 and 28 days after inoculation) *vs* control animals; *H. pylori* infected animals 7 days *vs* animals 28 days from the last inoculation.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g004

acute phase of infection (in our study, 7 days after the last inoculation), to protect the gastric epithelium against adverse consequences of the inflammatory response. Programmed cell death can reduce microbial infection, separate infected cells from uninfected ones, and alert the host immune system about the danger signals and elevation of inflammatory mediators [67]. Apoptotic cells can induce the production of anti-inflammatory mediators such as transforming growth factor (TGF), prostaglandin E2, and platelet activating factor by macrophages [68]. Many factors, including infectious agents and their components as well as signal proteins from several signaling pathways activated during the inflammation process, are involved in the regulation of cell apoptosis. Usually, the clearance of apoptotic cells by macrophages and epithelial cells downregulates the inflammatory response; however, *H. pylori* show the ability to diminish the phagocytic activity of neutrophils and macrophages using a variety of strategies [19–20, 69]. This disorder can result in the failed clearance of apoptotic cells and prolongation of the inflammatory response, which was shown for the first time in pulmonary diseases [70]. Bimczok et al. [71] revealed that epithelial cells undergoing apoptosis in response to live *H. pylori* were not eliminated by human gastric mononuclear phagocytes, even though they were under the influence of TNF-α, released by macrophages and highly expressed in *H. pylori*-infected gastric mucosa in comparison to control cells [71]. In the present study, an intense infiltration of the gastric mucosa in *H. pylori*-infected animals by lymphocytes may suggest their role in the apoptosis of gastric epithelial cells, which was also suggested by other authors [72–73].

The loss of epithelial cells within the gastric tissue during *H. pylori* infection requires enhancement of the proliferative activity of gastric epithelial cells. In this study, the Ki-67 protein was a marker of cell proliferation in the gastric tissue of control or infected animals. Our results indicated that epithelial cells proliferated more intensively in the chronic phase of infection, suggesting the pro-regenerative potential of these cells **(Fig 4C i, ii)**. However, the elevated proliferation activity of gastric epithelial cells in response to *H. pylori* may increase the risk of mutations, which can be relevant for gastric cancer development [74].

Cell study–response to soluble components of *H. pylori*

H. pylori bacteria are the source of a variety of soluble or cell surface-bound virulent factors, which, by associating with host cells, influence disease development [22,75–76]. We employed primary gastric epithelial cells and fibroblasts to study *in vitro* the effects of well-characterized *H. pylori* antigens such as GE, CagA, UreA and LPS on the condition of the epithelial cell barrier. Importantly, both types of cells used in the experiments were developed from a guinea pig, which made the model more relevant to an *in vivo* model of *H. pylori* infection used in this study. Fibroblasts, which are present in the subepithelial mucosa, can be targeted by *H. pylori* compounds, which leak through epithelial lesions or are transferred there via the epithelium [77]. Furthermore, fibroblasts are involved in the wound healing process and inflammation by responding to pro-inflammatory cytokines [78–79]. Our results showed a significant increase in 4HNE due to lipid peroxidation in primary gastric epithelial cells as well as fibroblasts in response to stimulation with *H. pylori* components **(Fig 5A i, ii and Fig 5B i, ii)**. Interestingly, the level of 4HNE in gastric epithelial cells upon stimulation with *H. pylori* LPS was almost as intensive as in response to *E. coli* endotoxin (positive control). Moreover, the increased amount of 4HNE in gastric epithelial cells and fibroblasts stimulated with *H. pylori* LPS was parallel with the MMP-9 release to the culture supernatants **(Fig 5C i, ii),** which may

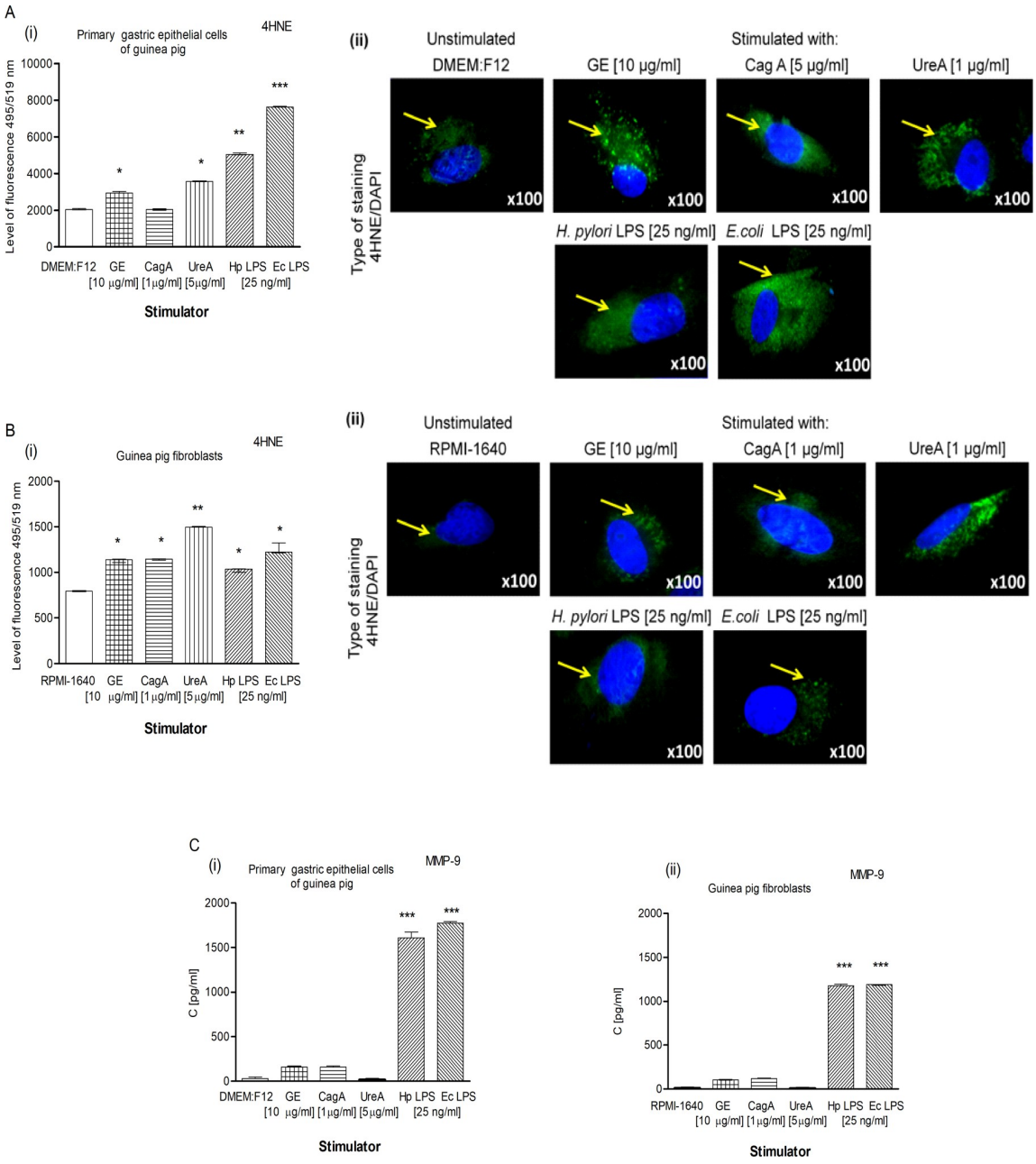


Fig 5. Determinants of oxidative stress in the guinea pig primary gastric epithelial cells and fibroblasts. Oxidative stress assessment based on the production of 4HNE estimated in primary gastric epithelial cells (**A**) and fibroblasts (**B**), nontreated or treated for 24h with *H. pylori* antigens: glycine acid extract (GE) (10 μg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 μg/ml), urease A subunit (Ure A) (5 μg/ml) and *H. pylori* (Hp) or *E. coli* (Ec) lipopolysaccharide (LPS) (25 ng/ml). **(i)** Fluorescence intensity of 4HNE in the epithelial cells or fibroblasts measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). **(ii)** Representative images of primary gastric epithelial cells and fibroblasts stained for 4HNE and photographed in a fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany). DAPI was used for nuclear staining. The yellow arrows show 4HNE localization in cells. **(C)** Production of MMP-9 by primary gastric epithelial cells **(i)** and fibroblasts **(ii)** in response to *H. pylori* compounds detected using the ELISA assay. The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained for unstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g005

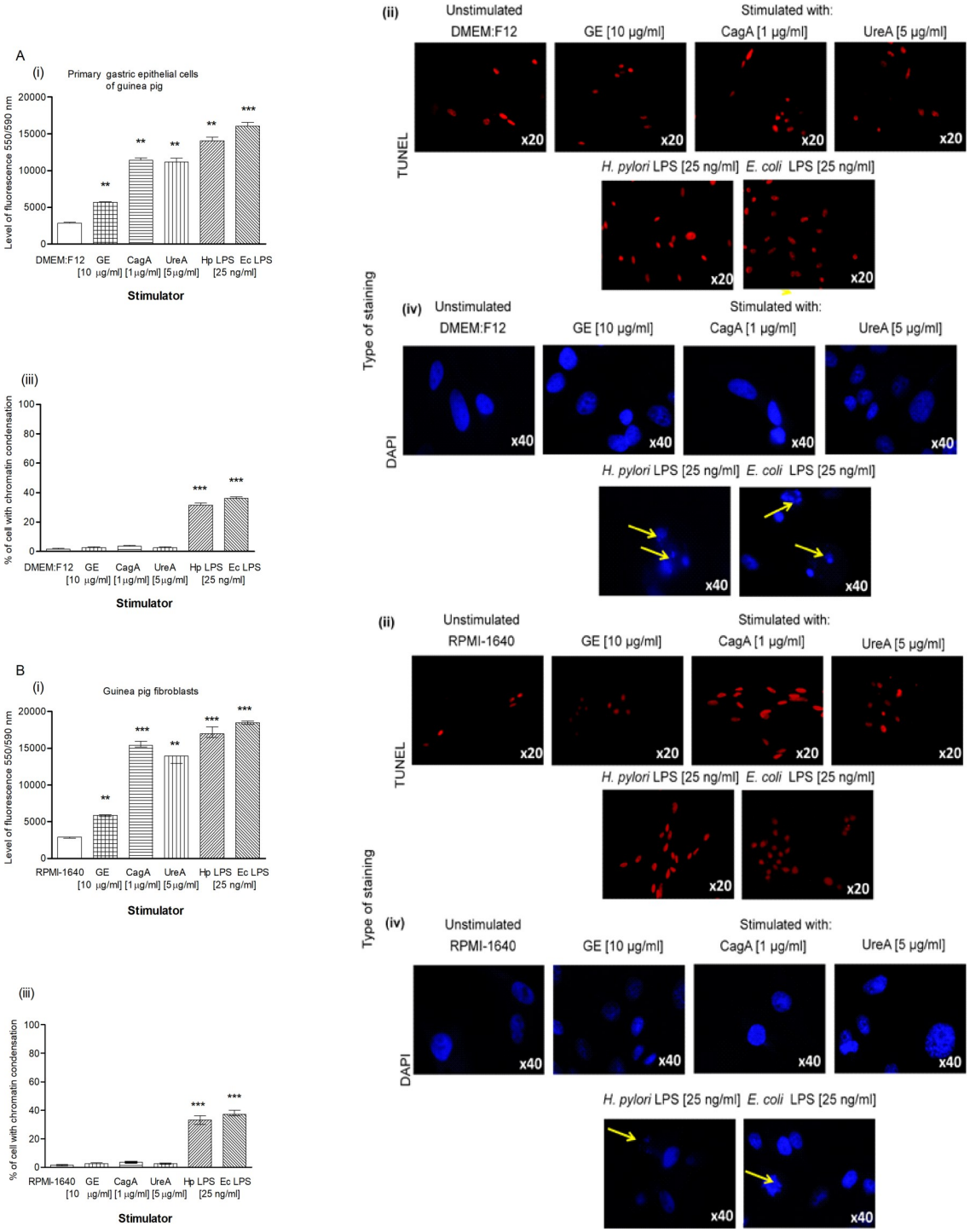


Fig 6. Detection of apoptosis intensity in gastric epithelial cells and fibroblasts treated with *H. pylori* components. Cell apoptosis assessed by the TUNEL assay and nuclear staining with DAPI was estimated in cell cultures of primary gastric epithelial cells **(A)** and fibroblasts **(B)**, unstimulated or stimulated for 24h with bacterial antigens: glycine acid extract (GE) (10 µg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 µg/ml), urease A subunit (Ure A) (5 µg/ml) and *H. pylori* (Hp) or *E. coli* (Ec) lipopolysaccharide (LPS) (25 ng/ml). **(i)** Intensity of fluorescence of primary epithelial cells and fibroblasts stained in the TUNEL assay and counted using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). **(ii)** Representative images of primary epithelial cells or fibroblasts stained in the TUNEL assay (red nuclei) photographed in a fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany) at wavelengths: 550 nm (excitation) and 590 nm (emission). **(iii)** The percentage of primary epithelial cells and fibroblasts stained with DAPI and indicated DNA damage. **(iv)** Representative images of primary epithelial cells and fibroblasts stained with DAPI (blue

nuclei) and photographed in a fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany) at wavelengths: 345 nm (excitation) 455 nm (emission). Yellow arrows show disintegration of chromatin. The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained for unstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g006

also be also potentially reflected *in vivo*. However, there was no significant difference in the MMP-9 concentration between uninfected cells and the cells treated with GE, CagA or UreA. This may suggest that *in vivo* during *H. pylori* infection, MMP-9 can be delivered by the immunocompetent cells infiltrating the gastric mucosa, particularly granulocytes.

Our results obtained by the TUNEL assay showed an increased number of primary gastric epithelial cells (**Fig 6A, i, ii**) and fibroblasts (**Fig 6B i, ii**) undergoing apoptosis in response to the treatment with GE, CagA, UreA or LPS of *H. pylori*, and the LPS showed the strongest pro-apoptotic activity, similar to *E. coli* LPS. In cultures treated with *H. pylori* LPS or standard *E. coli* LPS, apoptosis was irreversible, as confirmed by the chromatin condensation and disintegration of cell nuclei in DAPI staining (**Fig 6A iii, iv and Fig 6B, iii, iv).** To confirm our observation that *H. pylori* components upregulated apoptosis of both types of cells, as detected by the TUNEL stain, we analyzed cleaved pro-apoptotic caspase 3 (CC3) and Bax as well as anti-apoptotic Bcl-xL and Bcl-2 expression in cells. As shown in **Fig 7A i, ii** and **Fig 7B i, ii**, the expression of anti-apoptotic Bcl-xL was downregulated, whereas the expression of pro-apoptotic CC3 increased in gastric epithelial cells and fibroblasts treated with *H. pylori* components. Because gastric epithelial cells and fibroblasts stimulated with *H. pylori* LPS released a significant amount of MMP-9 into the culture environment and this enzyme is a well-recognized inducer of cell apoptosis [64], we studied its role in *H. pylori*-induced cell survival regulation. The addition of exogenous MMP-9 to the cultures of gastric epithelial cells and fibroblasts, which were carried out with *H. pylori* components, resulted in a more intense production of CC3, a diminished expression of anti-apoptotic Bcl-xL (**Fig 8A and 8B**) and anti-apoptotic Bcl-2 protein, and an increased expression of pro-apoptotic Bax protein (**Fig 9A and 9B**). Pierzchalski et al. [80] suggested that only live *H. pylori* bacteria were capable of inducing caspase-3-dependent apoptosis in gastric epithelial cells. Our results showed not only irreversible apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts exposed to *H. pylori* LPS but also a reduced proliferative activity of cells measured in the MTT reduction assay and a radioactive assay (**Figs 10A and 1B**) and diminished cell migration in the scratch assay, suggesting its role in making cells unable to repair the damage (**Fig 11A and 11B**).

It has been shown previously that pathogenic effects of *H. pylori* LPS were linked to upregulation of gastric mucosal proinflammatory cytokine expression, excessive nitric oxide production, diminished production of regulatory cytokines, and abrogation of cell cycle progression and cell proliferation [45, 81–82]. Li et al. [83] noticed that LPS regulated pro-apoptotic MMP-9 expression through Toll-like (TLR)4/NF-κB signaling, and Cho et al. [84] reported the induction of apoptosis-related genes in human carcinoma cells by *H. pylori* VacA toxin [83–84]. This toxin is mainly secreted by *H. pylori* to the gastric environment; however, it is also exposed on the surface of bacterial cells and present in the membrane vesicles [76]. Previously, we showed that the proliferation of human peripheral blood lymphocytes was inhibited in the presence of an antigenic complex from *H. pylori* G27 VacA+CagA- but not from the G27 VacA-CagA- mutant strain [85]. In the present study, gastric epithelial cells and fibroblasts were stimulated with the glycine acid extract from the *H. pylori* CCUG 17874 VacA+CagA+ strain. Therefore, it is possible that VacA could be responsible for certain effects demonstrated in this study. However, further studies are needed to elucidate the involvement of VacA in the regulation of MMP-9 as well as the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells.

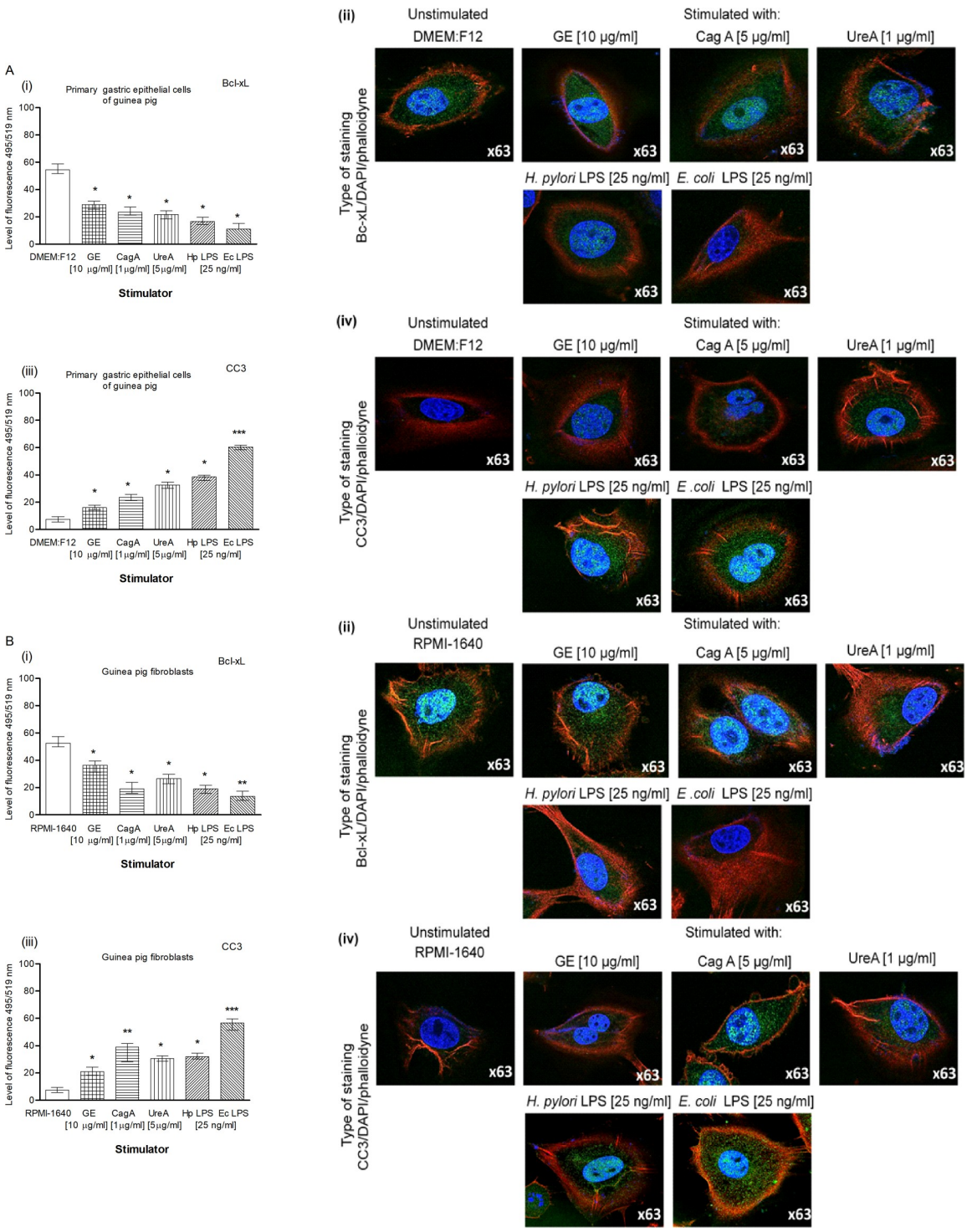


Fig 7. The Bcl-xL and CC3 in gastric epithelial cells and fibroblasts treated with *H. pylori* components. Level of anti-apoptotic Bcl-xL and cleaved pro-apoptotic caspase 3 (CC3) in cell cultures of primary gastric epithelial cells **(A)** and fibroblasts **(B)** unstimulated or stimulated for 24h with bacterial antigens: glycine acidextract (GE) (10 µg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 µg/ml), urease A subunit (Ure A) (5 µg/ml), *H. pylori* (Hp) and *E. coli* (Ec) lipopolysaccharide (LPS) (25 ng/ml). Level of intensity of Bcl-xL**(i)** and CC3 **(iii)** in primary epithelial cells and fibroblasts was measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). Representative images of primary epithelial cells and fibroblasts stained for Bcl-xL **(ii)** and CC3 **(iv)** and photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP). DAPI was used for nuclear staining and phalloidine for cytoskeleton staining. The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained for unstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g007

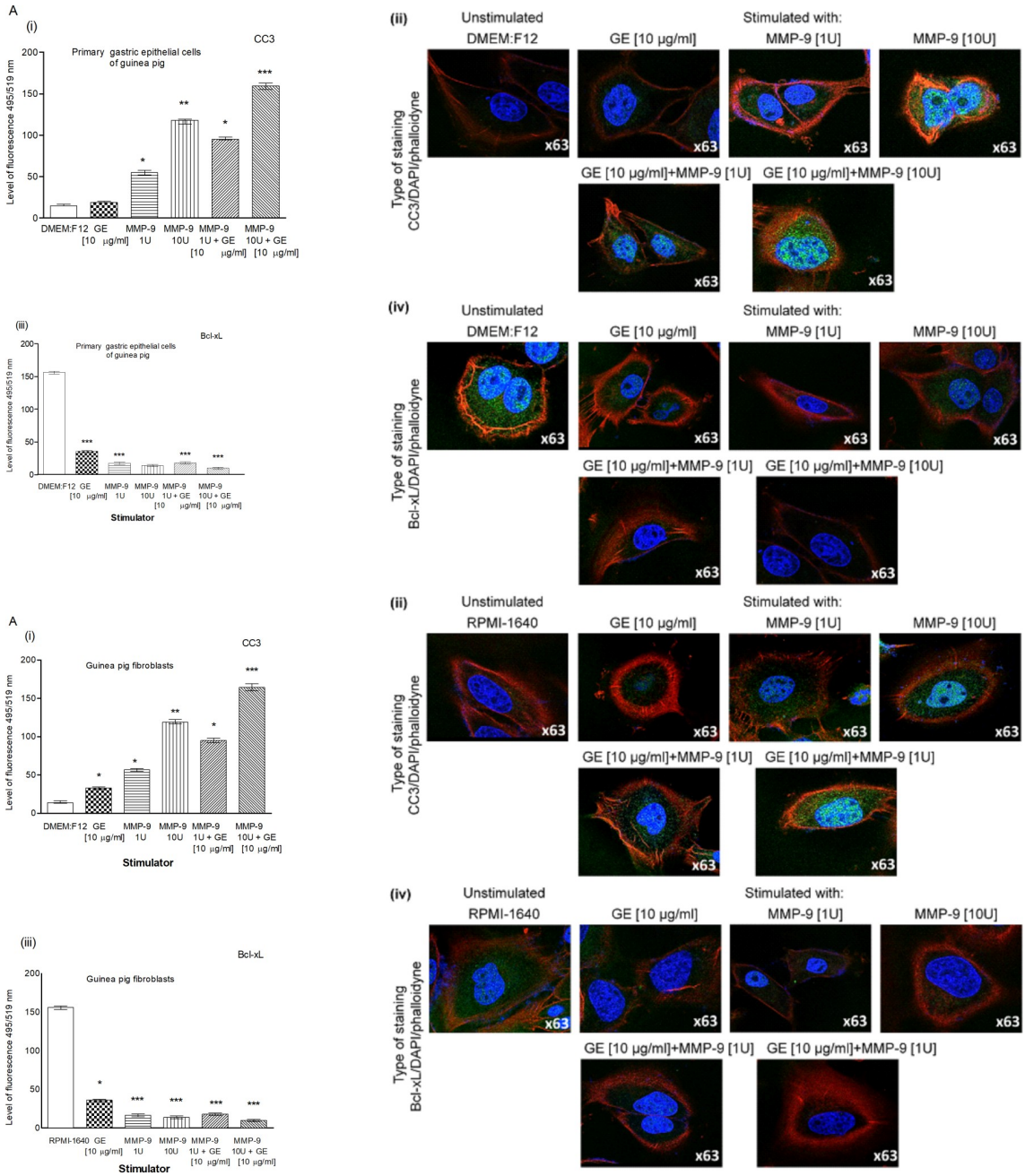


Fig 8. The Bcl-xL and CC3 in gastric cells and exposed to *H. pylori* components and/or metalloproteinase (MMP)-9. Level of anti-apoptotic Bcl-xL and cleaved pro-apoptotic caspase 3 (CC3) in cell cultures of primary gastric epithelial cells **(A)** and fibroblasts **(B)** unstimulated or stimulated for 24h with: glycine acid extract (GE) (10 μg/ml), MMP-9 (1 U– 7.5 ng/ml), MMP-9 (10 U– 75 ng/ml), MMP-9 (1 U– 7.5 ng/ml) + GE (10 μg/ml) and MMP-9 (10 U– 75 ng/ml) + GE (10 μg/ml). Level of intensity of Bcl-xL **(i)** and CC3 **(iii)** in primary epithelial cells and fibroblastsmeasured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). Representative images of primary epithelial cells and fibroblasts stained for Bcl-xL **(ii)** and CC3 **(iv)** and photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP). DAPI was used for nuclear staining and phalloidine for cytoskeleton staining. The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained forunstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g008

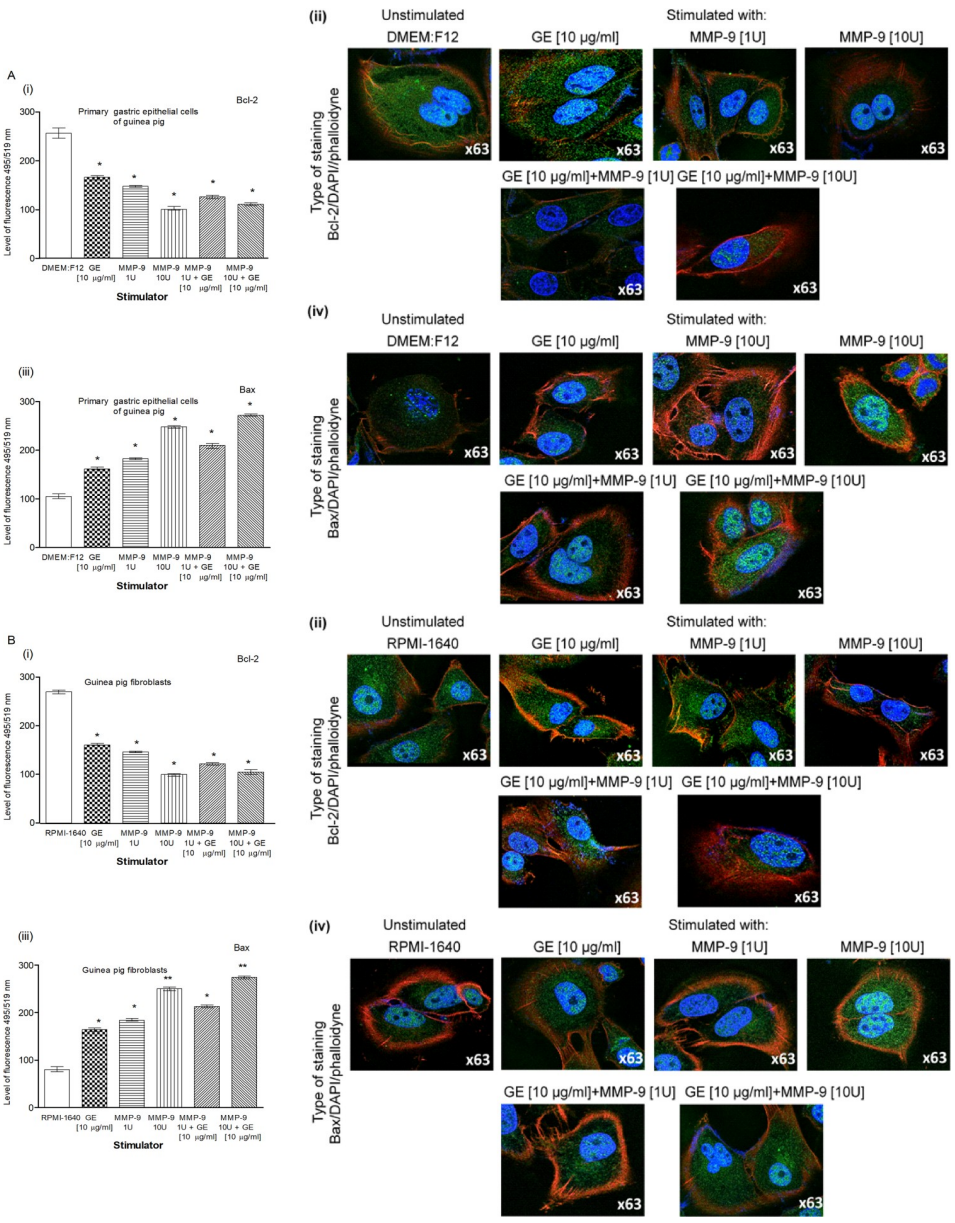


Fig 9. The Bax and Bcl -2 in gastric cells exposed to *H. pylori* components and/or metalloproteinase (MMP-9). Level of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 in cell cultures of primary gastric epithelial cells **(A)** and fibroblasts **(B)** unstimulated or stimulated for 24h with: glicyne acid extract (GE) (10 µg/ml), MMP-9 (1 U– 7.5 ng/ml), MMP-9 (10 U– 75 ng/ml), MMP-9 (1 U– 7.5 ng/ml) + GE (10 µg/ml) and MMP-9 (10 U– 75 ng/ml) + GE (10 µg/ml). Level of intensity of Bax **(i)** and Bcl-2 **(iii)** in primary epithelial cells and fibroblasts measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). Representative images of primary epithelial cells and fibroblasts stained for Bax **(ii)** and Bcl-2 **(iv)** and photographed in a confocal microscope (LeicaTCS SP). DAPI was used for nuclear staining and phalloidine for cytoskeleton staining. The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained for unstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g009

In conclusion, the results obtained using an *in vivo* model of guinea pigs experimentally infected with *H. pylori* and *in vitro* cellular models of guinea pig primary gastric epithelial cells and fibroblasts indicated that during *H. pylori* infection, the soluble virulence factors of these

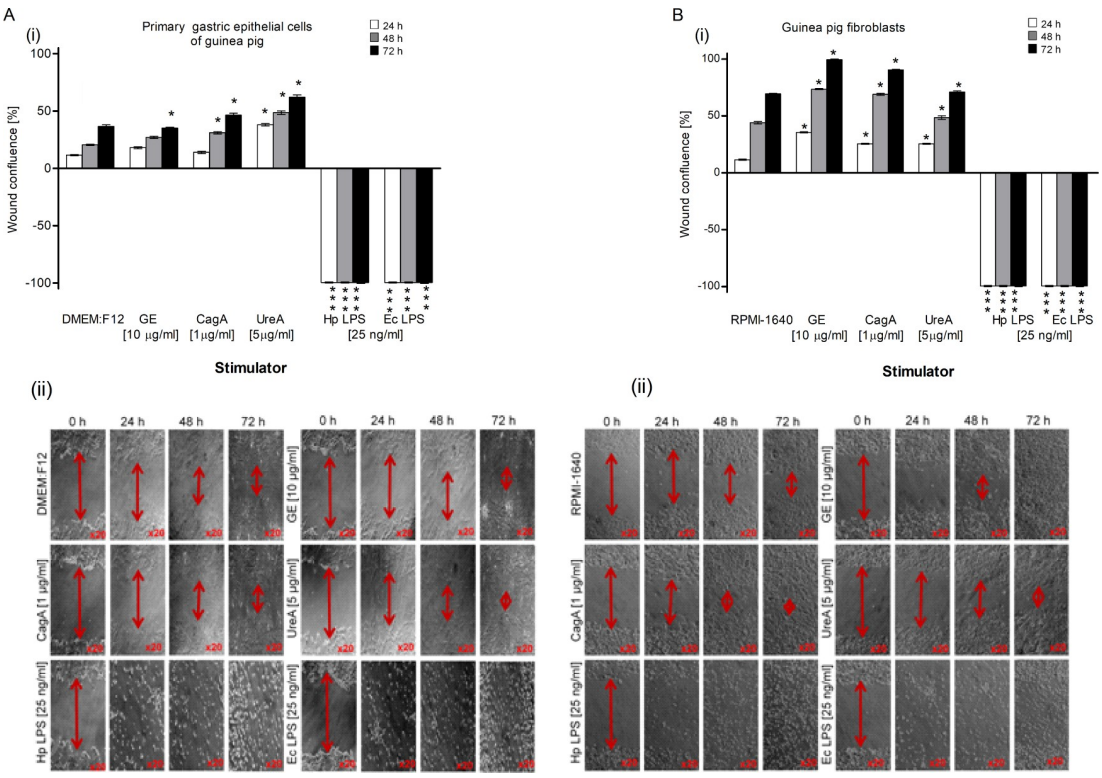


Fig 10. Total cell growth of gastric epithelial cells and fibroblasts exposed to *H. pylori* components. Total cell growth of primary gastric epithelial cells (**A**) and fibroblasts (**B**) unstimulated or stimulated with bacterial antigens: glycine acid extract (GE) (10 μg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 μg/ml), urease A subunit (Ure A) (5 μg/ml) and *H. pylori* (Hp) or *E. coli* (Ec) lipopolysaccharide (LPS) (25 ng/ml) detected based on (^{3}H)-thymidine incorporation into cellular DNA **(i)** or MTT reduction assay **(ii). (i)** Proliferation of primary gastric epithelial cells or fibroblasts shown as the graph presenting a stimulation index (SI) calculated by dividing the radioactivity counts (cpm/min), for the cell cultures in the presence of a stimulus, by the counts for control cell cultures in culture medium alone. The results are shown as median value with a range. The results obtained for six independent experiments, performed in triplicates for each experimental variant are presented. **(ii)** Reduction of MTT salt by primary epithelial cells and fibroblasts shown as a graph presenting the average percentage of cells (unstimulated and stimulated with *H. pylori* antigens) able to reduce MTT. Data represent the average values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained for unstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g010

bacteria that are present in a colonization niche can induce cell apoptosis and inhibition of cell proliferation in relation to the inflammatory response and increased oxidative stress. The loss of cells affects the integrity and protective function of the gastric epithelial barrier. *H. pylori* components can potentially penetrate the gastric barrier into the basement membrane, where they can affect the pro-regenerative function of fibroblasts supporting the inflammatory response and the development of pathological effects. By crossing these gastric tissue barriers, *H. pylori* components can also influence immune cells. However, the results from cellular experiments *in vitro*, in which recombinant proteins are used, should be interpreted with caution. It is not clear whether the effects that they induce are identical to those that are caused by living bacteria.

Our group and other authors have shown previously that some *H. pylori* components, including CagA or LPS, have negative immunomodulatory properties, which can facilitate the survival of bacteria and long-lasting infection, thus increasing the risk for ulcer disease and cancer development [20, 23,43, 85–89]. It is worth emphasizing that the effects of individual *H.*

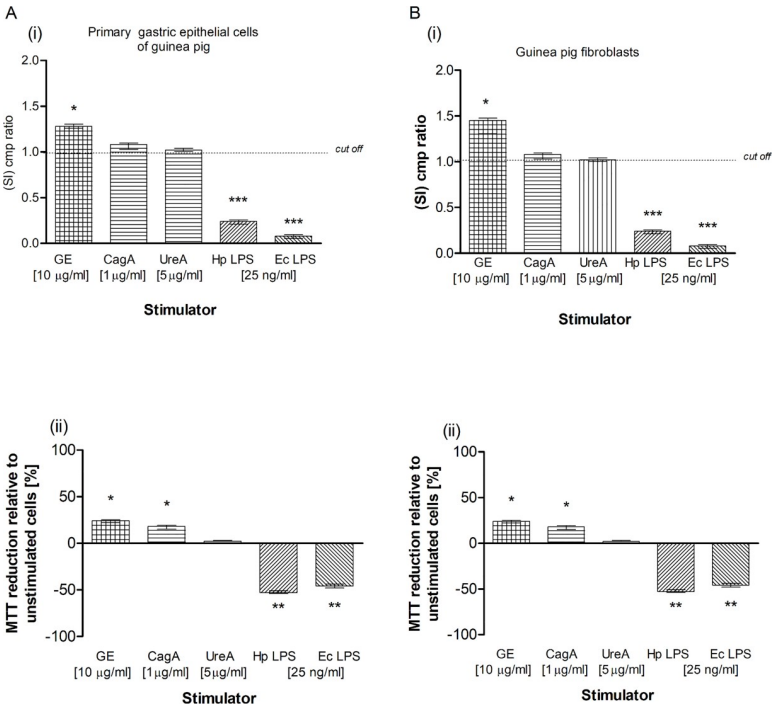


Fig 11. The effectiveness of migration of gastric epithelial cells and fibroblasts exposed to *H. pylori* components. The migration of primary gastric epithelial cells **(A)** and fibroblasts **(B)** unstimulated or treated with: glycine acid extract (GE) (10 μg/ml), cytotoxin associated gene A (CagA) protein (1 μg/ml), urease A subunit (Ure A) (5 μg/ml), *H. pylori* (Hp) or *E. coli* (Ec) lipopolysaccharide (LPS) (25 ng/ml) and detected in a scratch assay. **(i)** The migration of primary epithelial cells and fibroblasts shown as a graph presenting wound confluence [%] (average wound size against time). The results are presented as median values of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed in the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ obtained for unstimulated cells *vs* cells treated with *H. pylori* antigens (according to the used stimulators). **(ii)** Phase-contrast microscopy images of a scratch assay. Pictures were taken at the indicated time points and the extent of wound closure for each treatment variant is shown (red arrows). Representative images of each time point for both types of cells are shown.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.g011

pylori components may be different. Therefore, considering the island-like nature of *H. pylori* infection, it should be assumed that the ratio between the individual components may have a significant impact on their effects in the colonization site. The persistence of the inflammatory reaction together with the simultaneous increase in the proliferation rate of gastric epithelial cells may pose a risk of neoplastic changes, especially in the inflammatory milieu induced by *H. pylori* [90]. The translocation of *H. pylori* compounds through the digestive tract can potentially induce systemic effects in the host in response to *H. pylori* infection.

Acknowledgments

We want to thank A. Covacci, (IRIS, Siena, Italy) for providing rCagA protein and J. Cwynar, for professional linguistic correction.

Author Contributions

Conceptualization: Magdalena Chmiela.

Data curation: Weronika Gonciarz.

Formal analysis: Weronika Gonciarz.

Investigation: Weronika Gonciarz.

Methodology: Weronika Gonciarz, Agnieszka Krupa, Krzysztof Hinc, Michał Obuchowski, Anthony P Moran, Adrian Gajewski.

Supervision: Magdalena Chmiela.

Validation: Weronika Gonciarz.

Visualization: Weronika Gonciarz.

Writing – original draft: Weronika Gonciarz, Agnieszka Krupa, Magdalena Chmiela.

Writing – review & editing: Weronika Gonciarz, Agnieszka Krupa, Magdalena Chmiela.

References

1. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. Science. 2003; 300:1430–1434. https://doi.org/10.1126/science.1081919 PMID: 12775840
2. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1983; 1:1273–5. PMID: 6134060
3. Structure Hatakeyama M. and Function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. Proc Biol Sci. 2017; 93:196–219. https://doi.org/10.2183/pjab.93.013
4. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H. et al. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. Oncogene. 2007; 26: 4617–4626. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210251 PMID: 17237808
5. Fischer W, Prassl S, Haas R. Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Curr Top Microbiol Immunol. 2009; 337:129–171. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01846-6_5_5 PMID: 19812982
6. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/ MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature. 2007; 447: 330–333. https://doi.org/10.1038/nature05765 PMID: 17507984
7. Lu H, Murata-Kamiya N, Saito Y, and Hatakeyama M. Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. J Biol Chem. 2009; 284:23024–23036. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001008 PMID: 19553659
8. Tan S, Tompkins LS, Amieva MR. *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. PLoS Pathog. 2009; 5:e1000407. 10.1371/journal.ppat.1000407 PMID: 19412339
9. Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. J Gastroenterol Hepatol. 1997; 12:473–480. PMID: 9257236
10. Xiang Z,Bugnoli M, Ponzetto M, Morgando A, Figura N, Covacci A, et al.Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect. *Di*s. 1993; 12:739–745. PMID: 8307041
11. Smita A, Murali KR, Geraldine T, Miller G, Blaser MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. Infect Immum. 1995; 63:1681–1687.
12. Tanahashi T, Kita M, Kodama T, Yamaoka Y, Sawai N, Ohno T. et al. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. Infect Immun. 2000; 68:664–671. https://doi.org/10.1128/iai.68.2.664-671.2000 PMID: 10639431
13. Bäckhed F, Torstensson E, Seguin D, Richter-Dahlfors A, Rokbi B. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-8 receptor expression in the human gastric epithelium. Infect Immun. 2003; 71:3357–3360. https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3357-3360.2003 PMID: 12761119
14. Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Giudice G, et al The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. Eur J Immunol. 2003; 33:840–849. https://doi.org/10.1002/eji.200323726 PMID: 12672049
15. Amedei AA, Cappon G, Codolo A, Cabrelle A, Polenghi M,Benagiano E. et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. J Clin Invest. 2006; 116:1092–1101. https://doi.org/10.1172/JCI27177 PMID: 16543949

16. Beswick EJ, Pinchuk IV, Minch K, Suarez G, Sierra JC, Yamaoka Y, et al. The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappa B activation and interleukin-8 production. Infect Immun. 2006; 7:1148–55. https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1148–1155.2006

17. Wilson KT, Crabtree JE. Reviews in basic and clinical gastroenterology. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. Gastroenterology. 2007; 133: 288–308. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.008 PMID: 17631150

18. Wessler S, Backert S. Molecular mechanisms of epithelial barrier disruption by *Helicobacter pylori*. Trends Microbiol. 2008; 16: 397–405. https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.05.005 PMID: 18619844

19. Allen LAH. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. Cell Microbiol. 2007; 9: 817–828. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00906.x PMID: 17346311

20. Grebowska A, Moran AP, Matusiak A, Bak-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Rechciński T, et al. Antiphagocytic activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide (LPS)-possible modulation of the innate immune response to these bacteria. Pol J Microbiol. 2008; 57:185–192. PMID: 19004238

21. Ramarao N, Meyer TF. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. Infect Immun. 2004; 69:2604–2611. https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2604–2611.2001

22. Chmiela M, Miszczyk E, Rudnicka K. Structural modifications of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace. World J Gastroenterol. 2014; 20: 9882–9897. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9882 PMID: 25110419

23. Rudnicka K, Miszczyk E, Matusiak A, Walencka M, Moran AP, Rudnicka W, et al. *Helicobacter pylori*-driven modulation of NK cell expansion, intracellular cytokine expression and cytotoxic activity. Innate Immun. 2015; 21:127–139. https://doi.org/10.1177/1753425913518225 PMID: 24448078

24. Geijtenbeek TBH, Engering A, Kooyk Y. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. J Leukocyte Biol. 2002; 71:921–931. PMID: 12050176

25. Bergman MP, Engering A, Smits HH, Vliet SJ, Bodegraven AA, Wirth H, et al. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. J Exp Med. 2004; 8:979–990. https://doi.org/10.1084/jem.20041061

26. Kranzer K, Eckhardt A, Aigner M, Knoll G, Deml L, Speth C, et al. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. Infect Immun. 2004; 72:4416–4423. https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4416-4423.2004 PMID: 15271898

27. Cambi A, Figdor C. Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins. Curr Opin Immunol. 2005; 17:345–351. https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.05.011 PMID: 15950451

28. Tan MP, Pedersen J, Zhan Y, Lew AM, Pearse MJ, Wijburg OLC, Strugnell RA. $CD8^+$ T cells are associated with severe gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice in the absence of $CD4^+$ T Cells. Infect Immun. 2008; 76: 1289–1297. https://doi.org/10.1128/IAI.00779-07 PMID: 18025102

29. Cheng HH, Tseng GY, Yang HB, Wang HJ, Lin HJ, Wang WC. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. World J Gastroenterol. 2012; 18:34–43. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i1.34 PMID: 22228968

30. Kaebisch R, Mejías-Luque R, Prinz C, Gerhard M. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3. J Immunol. 2014; 192:316–323. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302476 PMID: 24293633

31. Miszczyk E, Rudnicka K, Moran AP, Fol M, Kowalewicz-Kulbat M, Druszczyńska M, Matusiak A, et al. Interaction of *Helicobacter pylori* with C-type lectin dendritic cell-specific ICAM grabbing nonintegrin. J Biomed Biotechnol. 2012:206463. https://doi.org/10.1155/2012/206463 PMID: 22550396

32. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest. 2004; 113:321–333. https://doi.org/10.1172/JCI20925 PMID: 14755326

33. Walencka M, Gonciarz W, Mnich E, Gajewski A, Stawerski P, et al. The microbiological, histological, immunological and molecular determinants of *Helicobacer pylori* infection in guinea pigs as a convenient animal model to study pathogenicity of these bacteria and the infection dependent immune response of the host. Acta Biochim Pol. 2015; 62:697–706. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1110 PMID: 26610308

34. Logan SM, Trust TJ. Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. 1983; 42:675–682. PMID: 6642648

35. Czkwianianc E, Chmiela M, Lawnik M, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W.Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in children with gastroduodenitis. Centr Eur J Immunol. 1997; 22: 240–247.

36. Rechciński T, Chmiela M, Małecka-Panas E, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W. Serological indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. Microbiol Immunol. 1997; 41:387–393. PMID: 9194037

37. Covacci A,Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90:5791–5795. https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5791 PMID: 8516329

38. Xiang Z, M. Bugnoli M, Ponzetto A, Morgando N, Figura A. Covacci R. et al. Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect *Dis*. 1993; 12:739–745. PMID: 8307041

39. Hinc K, Isticato R, Dembek M, Karczewska J, Iwanicki A, Peszyńska-Sularz G, et al. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. Microb Cell Fact. 2010; 9:2. https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-2 PMID: 20082702

40. Westphal O,Lüderitz O, Bister F. Über die extraktion von bakterien mit phenol-wasser. Z. Naturforsch. 1952; 78:148–155.

41. Moran AP, Helander IM, Kosunen TU. Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides. J Bacteriol. 1992; 174:1370–1377. https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1370-1377.1992 PMID: 1735724

42. Miszczyk E, Walencka M, Rudnicka K, Matusiak A, Rudnicka W, Chmiela M. Antigen-specific lymphocyte as a marker of immune response in guinea pigs with sustained *Helicobacter pylori* infection. Acta Biochim Pol. 2014; 61:295–303. PMID: 24918491

43. Mnich E, Gajewski A, Rudnicka K, Gonciarz W, Stawerski P, Hinc K, et al. Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *Helicobacter pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion. Acta Biochim Pol. 2015; 62:641–650. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1045 PMID: 26523406

44. Gonciarz W, Walencka M, Moran A.P, Hinc K, Obuchowski M, Chmiela M. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. J Biomed Sci. 2019; 26:23. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0515-z PMID: 30841890

45. Mnich E, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Hinc K, Obuchowski M, Gajewski A, et al. Impact of *Helicobacter pylori* on the healing process of the gastric barrier. World J Gastroenterol. 2016; 22:7536–58. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i33.7536 PMID: 27672275

46. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using image. Anat Rec (Hoboken). 2013; 3:378–381. https://doi.org/10.1002/ar.22641

47. Terano A, Ivey KJ, Stachura J, Sekhon S, Hosojima H, McKenzie WN, Krause WJ, et al. Cell culture of rat gastric fundic mucosa. Gastroenterology. 1982; 83:1280–91. PMID: 6290309

48. Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. J Cell Sci. 1992; 101:219–23. PMID: 1569126

49. Stern AR, Stern MM, Van Dyke ME, Prideaux JK, Bonewald LF. Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. Biotechniques. 2012; 52:361–373, https://doi.org/10.2144/0000113876 PMID: 22668415

50. Wroblewski L, Peek RM. Targeted disruption of the epithelial barrier by *Helicobacter pylori*. Cell Commun Signal. 2011; 9:29. https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-29 PMID: 22044698

51. Caron TJ, Scott KE, Fox JG, Hagen SJ. Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal barrier. World J Gastroenterol. 2015; 21:11411–11427 https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11411 PMID: 26523106

52. Lee A. Animal models of *Helicobacter infection*. Mol Med Today. 1990; 5:500–50.

53. Miszczyk E, Walencka M, Chmiela M. Modele zwierzęce w badaniach nad przebiegiem zakażeń *Helicobacter pylori*. Post Hig Med Dośw. 2011; 68:603–615.

54. Nedrud JG. Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. FEMS Immunol Med Microbiol.1999; 24:243–250. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01290.x PMID: 10378428

55. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston. Am J Surg Pathol. 1996; 20:1161–81. PMID: 8827022

56. Kronsteiner B, Bassaganya-Riera J, Philipson C, Viladomiu M, Carbo A, Pedragosa M, Vento S, Hontecillas R. *Helicobacter pylori* infection in guinea pig model is dominated by Th1 and cytotoxic CD8+ T cell responses. Infect Immun. 2013; 81:3803–3813. https://doi.org/10.1128/IAI.00660-13 PMID: 23897614

57. Sturegard E, Sjunnesson H, Ho B, Willen R, Aleljung P, Ng HC, Wadström T. Severe gastritis in guinea pigs infected with *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 1998; 47: 1123–1129. https://doi.org/10.1099/00222615-47-12-1123 PMID: 9856649

58. Sjunnesson H, Sturegard E, Hynes S, Willén R, Feinstein R, Wadström T. Five month persistence of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs. APMIS. 2003; 111:634–642. PMID: 12969019

59. Sjoerdn G, Zarmina R, Gary D, Beavan JR, Gibson LJ, Owen R. Analysis of host responses of guinea pigs during *Helicobacter pylori* infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001; 30:151–156. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2001.tb01564.x PMID: 11267849

60. Sun YQ, Soderholm JD, Petersson F, Borch K. Long-standing gastric mucosal barrier dysfunction in *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mongolian gerbils. Helicobacter. 2004; 9:217–27. https://doi.org/10.1111/j.1083-4389.2004.00227.x PMID: 15165257

61. Yang JCh Chien CT, Oxidative stress involved autophagy and apoptosis in *Helicobacter pylori* related gastritis. Gastritis and gastric cancer. IntechOpen. 2011; https://doi.org/10.5772/24767

62. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Front Biosci. 2006; 11:1696–1700. PMID: 16368548

63. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and MMP-9 in acute ischemic stroke. Stroke. 2007; 39:100–104. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.488189 PMID: 18063832

64. Florence JM, Krupa A, Boosheri LM, Allen TC, Kurdowska AK. Metalloproteinase-9 contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis via protease activated receptor-1. PloS One. 2017; 12:e0171427. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171427 PMID: 28166283

65. Amieva M., El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 2008; 134:306–323. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.009 PMID: 18166359

66. Ernst PB, Peura DA Crove SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. Gastroenterology. 2006; 130:188–206. quiz 212–3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.032 PMID: 16401482

67. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol. 2008; 8:279–298. https://doi.org/10.1038/nri2215 PMID: 18340345

68. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine–dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta 1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest. 2002; 109:41–50. https://doi.org/10.1172/JCI11638 PMID: 11781349

69. Du SY, Wang HJ, Cheng HH, Chen SD, Wang LH, Wang WC. Cholesterol glucosylation by *Helicobacter pylori* delays internalization and arrests phagosome maturation in macrophages. J Microbiol Immunol. 2016; 49:636–645. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.05.011 PMID: 25070282

70. Hodge S, Hodge G, Scichitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. Immunol Cell. 2003; 81:289–296. https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01170.x

71. Bimczok D, Smythies LE, Waites KB, Grams JM, Stahl RD, Mannon PJ, et al. *H. pylori* infection inhibits phagocyte clearance of apoptotic gastric epithelial cells. J Immunol. 2013; 15:6626–6634. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203330

72. Strmberg E, Lundgren A, Edebo A, Lundin S, Svennerholm AM, Lindholm C. Increased frequency of activated T-cells in the *Helicobacter pylori*-infected antrum and duodenum. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 36:159–168. https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00026-9 PMID: 12738386

73. Perfetto B, Buommino E, Canozo N, Paoletti I, Corrado F, Greco R, et al. Interferon-gamma cooperates with *Helicobacter pylori* to induce iNOS-related apoptosis in AGS gastric adenocarcinoma cells. Res Microbiol. 2004; 4:259–66. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.007

74. Honig A, Witte F, Mirecka J, Binder C, Schauer A. *Helicobacter pylori*-induced hyperproliferation: relevance for gastric cancer development in connection with mutagenic factors. Anticancer Res. 2000; 20:1641–1648. PMID: 10928084

75. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. World J Gastroenterol. 2017; 23:1521–15440. https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i9.1521 PMID: 28321154

76. Chmiela M, Walczak N, Rudnicka K. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles involvement in the infection development and *Helicobacter pylori*-related diseases. J Biomed Sci. 2018; 25:78. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0480-y PMID: 30409143

77. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, et al. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2007; 132:1009–1023. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.049 PMID: 17383424

78. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol. 1997; 51:317–322.

79. Wang J, Hori K, Ding J, Huang Y, Kwan P, Ladak A, et al. Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. J Cell Physiol. 2011; 226:1265–1273. https://doi.org/10.1002/jcp.22454 PMID: 20945369

80. Pierzchalski P, Pytko-Polonczyk J, Jaworek J, Konturek SJ, Gonciarz M. Only live *Helicobacter pylori* is capable of caspase-3 dependent apoptosis induction in gastric mucosa epithelial cells. J Physiol Pharmacol. 2009; 60:119–28.

81. Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: down-regulation of nitric oxide synthase-2 and caspase-3 by sulglycotide. Bioch Biophys Res Commun. 1999; 61:15–20.

82. Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM.Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. J Immunol. 2003; 170:6244–9. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6244 PMID: 12794156

83. Li H,. Xu H, Sun B. Lipopolysaccharide regulates MMP-9 expression through TLR4/NF-κB signaling in human arterial smooth muscle cells. Mol Med Rep. 2012; 6:774–8. https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1010 PMID: 22842850

84. Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. Toxicology. 2003; 42:601–611.

85. Paziak-Domańska B, Chmiela M, Jarosinska A, Rudnicka W. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. Cell Immunol. 2000; 202:136–139. https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1654 PMID: 10896773

86. Schwartz JT, Allen LA. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. J Leukocyte Biol. 2006; 79:1214–1225. https://doi.org/10.1189/jlb.0106030 PMID: 16543403

87. Lamb A, Chen LF. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. J Cell Biochem. 2013; 114:491–497. https://doi.org/10.1002/jcb.24389 PMID: 22961880

88. Lina TT, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol. 2014; 20:12753–66. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12753 PMID: 25278676

89. Rudnicka K, Matusiak A, Miszczyk E, Rudnicka W, Tenderenda M, Chmiela M. Immunophenotype of peripheral blood natural killer cells and IL-10 serum levels in relation to *Helicobacter pylori* status. APMIS. 2013; 121:806–813. https://doi.org/10.1111/apm.12120 PMID: 23758061

90. Subhash VV, Ho B. Inflammation and proliferation—a causal event of host response to *Helicobacter pylori* infection. Microbiology. 2015; 6:1150–60. doi: 10.1099/mic.0.000066.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Proregenerative Activity of IL-33 in Gastric Tissue Cells Undergoing *Helicobacter pylori*-Induced Apoptosis

Weronika Gonciarz, Agnieszka Krupa and Magdalena Chmiela *

Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-237 Lodz, Poland; weronika.gonciarz@biol.uni.lodz.pl (W.G.); agnieszka.krupa@biol.uni.lodz.pl (A.K.)
* Correspondence: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-635-41-86

Received: 16 January 2020; Accepted: 2 March 2020; Published: 5 March 2020

Abstract: Interleukin (IL)-33 is a proinflammatory mediator that alerts the host immune system to disorders in tissue homeostasis. Aim. To understand the role of IL-33 in modulating gastric tissue cell growth affected by *Helicobacter pylori (H. pylori*). Methods. IL-33 production in guinea pigs *(Caviae porcellus*) experimentally infected with *H. pylori* was evaluated by ELISA or immunohistochemical staining. The proregenerative activity of IL-33 was evaluated using gastric epithelial cells and fibroblasts that were naive or transfected with IL-33 siRNA exposed to *H. pylori* glycine acid extract antigenic complex (GE), as well as by measuring cell migration, proliferation, metabolic activity and apoptosis. Animals infected by *H. pylori* responded with increased production of IL-33. Also, cells treated in vitro with GE released more IL-33 than cells that were unstimulated. Silencing IL-33 in cells resulted in downregulation of metabolic activity, adhesion, migration and proliferation, especially after treatment with *H. pylori* GE, as well as upregulation of cells apoptosis associated with caspase 3 increase and Bcl-xL decrease, suggesting proregenerative activity of IL-33. Interestingly, upregulation of cell proliferation by IL-33 was Erk independent. Our results indicate that IL-33 may protect gastric tissue from loss of homeostasis caused by deleterious effects of *H. pylori* components and the inflammatory response developed during infection.

Keywords: *Helicobacter pylori;* gastric barrier; IL-33; proliferation; apoptosis

1. Introduction

The gastric mucosa is exposed to endogenous factors such as hydrochloric acid, pepsin, and bile acids, as well as exogenous factors, including ethanol, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and various microbial components [1,2]. Under physiological conditions, the mucous membrane maintains structural integrity due to pre-epithelial (phospholipid mucus phosphate), epithelial (carbohydrates, mucus, phospholipids, peptides, prostaglandins and heat shock proteins—Hsp) and postepithelial (hormones, growth factors and cytokines) defense mechanisms [3,4]. Microorganisms such as Gram-negative *Helicobacter pylori* (*H. pylori)* bacteria must overcome the mucous barrier to be able to reach epithelial cells and colonize the gastric epithelium (50% of the human population) [5,6]. The majority of *H. pylori*-infected individuals remain asymptomatic, but even in these subjects, infection increases the risk of serious diseases. A total of 10% to 15% of *H. pylori*-infected individuals develop chronic inflammatory responses, which correlate with an increased risk of gastric and duodenal ulcers, stomach cancer and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma [7–13].Chronic colonization of the gastric mucosa by *H. pylori* and long-lasting interaction between bacteria and their soluble or cell-bound components as well as gastric epithelial cells determine the pathogenic process [10,14,15]. *H. pylori* urease neutralizes gastric juice acidity and affects the

integrity of epithelial cell tight junctions [16]. Other virulence factors such as adhesins, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), neutrophil-activating factor (HP-NAP), vacuolating cytotoxin A (VacA), cytotoxin-associated gene A (Cag A) antigen and high temperature requirement A protein (HtrA) are involved in disease development [15,17–21]. *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS) shows lower endotoxicity compared to that of the LPS of classic enteropathogens due to having a different lipid A structure [22–25]. However, due to the presence of Lewis (Le) determinants that mimic the host Le components and the ability to modulate the activity of immunocompetent cells, *H. pylori* LPS can help these bacteria evade the immune mechanisms of the host or induce autoimmune responses [26–32].

Tissue injury and epithelial barrier disfunction induced by *H. pylori* result in the secretion of danger signals by the host cells. Emergency molecules such as double-stranded DNA (dsDNA), high motility group box-1 protein (HMGB-1), ATP, cholesterol crystals, interleukin (IL)-1β, IL-33, heat shock proteins (Hsps), mitochondrial DNA or mitochondrial *N*-formyl peptides, which are called DAMPs (damage-associated molecular patterns), alert the innate immune system to changes in homeostasis [33,34]. IL-33 is a newly described member of the IL-1 family of cytokines that is a DAMP and it is produced by cells under physiological conditions and potentially during several diseases. A summary of major IL-33 activities is presented in Table 1 [35–51].

Table 1. Summary of major IL-33 activities.

Function	Activity	Ref.
DAMP	signals the innate immune cells in response to stress or cell membrane disruption	[33,34]
Transcription factor	regulates the gene expression	[35–38]
Cytokine	signals the immune cells via ST2 receptor to eliminate infection and manage tissue injury (proregenerative activity)	[39–42]
	modulates the T helper 2 (Th2) lymphocytes as well as Th1 and regulatory lymphocytes	[43–45]
	upregulates the inflammatory response to bacterial LPS	[42]
	potentially is involved in the development of disease due to maintenance of chronic inflammation	[38,44–51]

DAMP (damage-associated molecular pattern); LPS (lipopolysaccharide); ST2 (secretory receptor, an interleukin (IL)-1 receptor family member); Th (T helper lymphocytes).

Increased expression of IL-33 has been shown in the gastric mucosa of patients infected with *H. pylori*. The level of IL-33 was higher in the acute phase of infection compared to that of the chronic phase [51]. Understanding the role of IL-33 in the pathogenesis of *H. pylori* infection requires further investigation. In our study, we used an experimental model of *H. pylori* infection in *Caviae porcellus* (guinea pigs) to examine by ELISA whether in vivo IL-33 was upregulated locally in gastric tissue homogenates and systemically in response to *H. pylori* infection. We also used cellular models of primary guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts, which are involved in wound healing in a subepithelial mucosa, for in vitro experiments [52,53]. By using these cells and by performing IL-33 silencing with siRNA, we examined how this cytokine influenced cell migration and proliferation, which are considered to be early biomarkers of cell regeneration activity. Cell migration and proliferation were evaluated in conjunction with cellular metabolic activity, shown as the ability of the cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) and 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Cell apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay, DNA damage was assessed by DAPI (4′,6-diamino-2-phenylindole) staining, and production of proapoptotic caspase-3 and antiapoptotic B cell lymphoma-extra-large (Bcl-xL) proteins was detected in cells by immunostaining. Activation/phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (pErk) was assessed in cells by using immunofluorescence.

2. Results

2.1. Production of IL-33 in Caviae porcellus colonized with H. pylori

The gastric tissue of guinea pigs inoculated with *H. pylori* was effectively colonized with the bacteria 7 and 28 days after the last inoculation, as shown by the staining of gastric tissue specimens with anti-*H. pylori* antibody conjugated to FITC (Figure 1A).

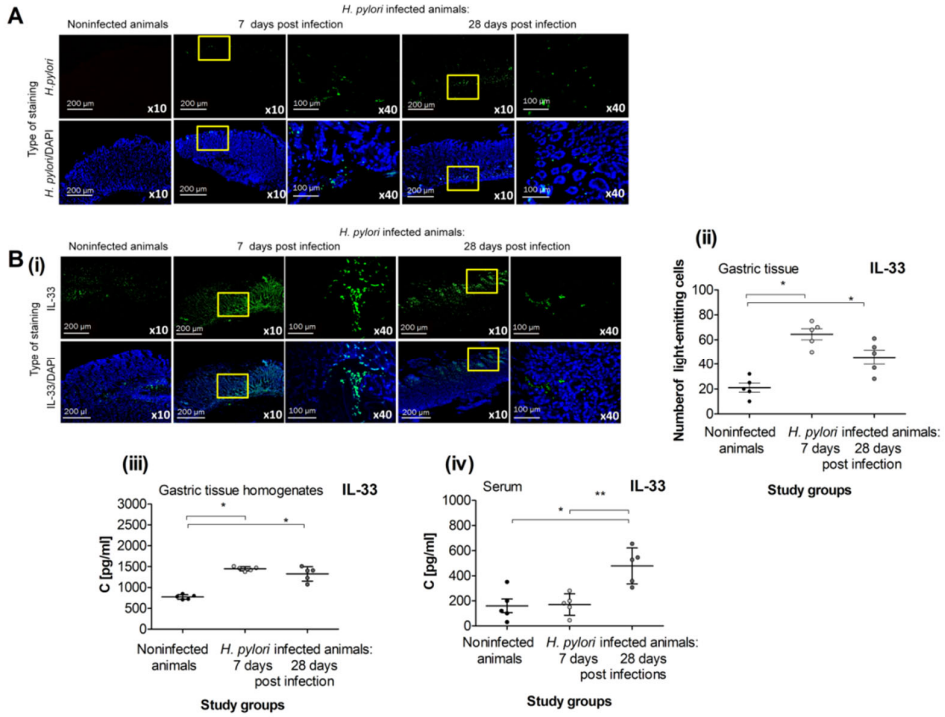


Figure 1. IL-33 in *Caviae porcellus* colonized with *H. pylori*. (**A**) Representative images of gastric tissue of guinea pigs noninfected or infected with *H. pylori,* 7 and 28 days from inoculation, stained with anti-*H. pylori* antibodies conjugated with FITC (fluorescein isothiocyanate; green) and counterstained with DAPI (4′,6-diamino-2-phenylindole; blue), photographed in the confocal microscope (Leica TCS SP, Wetzlar, Germany), at magnification ×10 or ×40. (**B**) Production of IL-33 in *H. pylori* infected vs. noninfected guinea pigs. (**i**) Representative images of gastric tissue of noninfected or *H. pylori* infected guinea pigs, 7 and 28 days from inoculation, stained with FITC-conjugated anti-IL-33 antibody (green) and counterstained with DAPI (blue), photographed in the confocal microscope (LeicaTCS SP, Wetzlar, Germany), at magnification ×10 or ×40. (**ii**) Level of intensity of IL-33 in the gastric tissue sections of noninfected or *H. pylori* infected guinea pigs, 7 and 28 days from inoculation, stained with FITC-conjugated anti-IL-33 antibody, assessed using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States). (**iii**) Level of IL-33 in gastric tissue homogenates of noninfected or *H. pylori* infected guinea pigs, 7 and 28 days from the last inoculation, estimated by using the ELISA assay. (**iv**) Level of IL-33 in serum samples of noninfected or *H. pylori* infected guinea pigs, 7 and 28 days from inoculation, estimated by using the ELISA assay. Results are showed as the median from the range of five experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed using the nonparametric U Mann-Whitney test with significance *, ** $p < 0.05$ (* non-infected versus infected animals 7 or 28 days after inoculation; ** animals 7 days versus 28 days after inoculation).

In the previous study performed on the same set of animals, we showed that gastric tissue colonization by *H. pylori* correlated with extended expression of mucin 5 (MUC5AC) and development of inflammation, which was acute after 7 days, whereas chronic inflammation occurred up to 28 days after the last inoculation [54]. Furthermore, infection was followed by

upregulation of oxidative stress and cell apoptosis in the gastric tissue of *H. pylori*-infected animals, and this process was more pronounced at 7 days post inoculation compared to that at 28 days post inoculation, whereas cell proliferation was increased during the chronic phase of infection (28 days after inoculation), suggesting the initiation of gastric tissue regeneration processes [55].

In vivo experiments performed in the present study showed that *H. pylori* infection resulted in elevated production of IL-33. The level of IL-33 was increased locally in the gastric cells and gastric tissue homogenates of *H. pylori*-infected vs. uninfected animals at 7 and 28 days after the last inoculation (Figure 1B(i)–B(iii)), and systemically in the serum samples at 28 days post infection (Figure 1B(iv)).

2.2. IL-33 Production in Cell Cultures Exposed to H. pylori Components

After considering the potential role of IL-33 in modulating gastric tissue regeneration, we used primary guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts and performed transfections with siRNA to silence IL-33. The transfection efficiency was 92%, and the representative cells that were positive for FITC-conjugated siRNA are shown on Figure 2A.

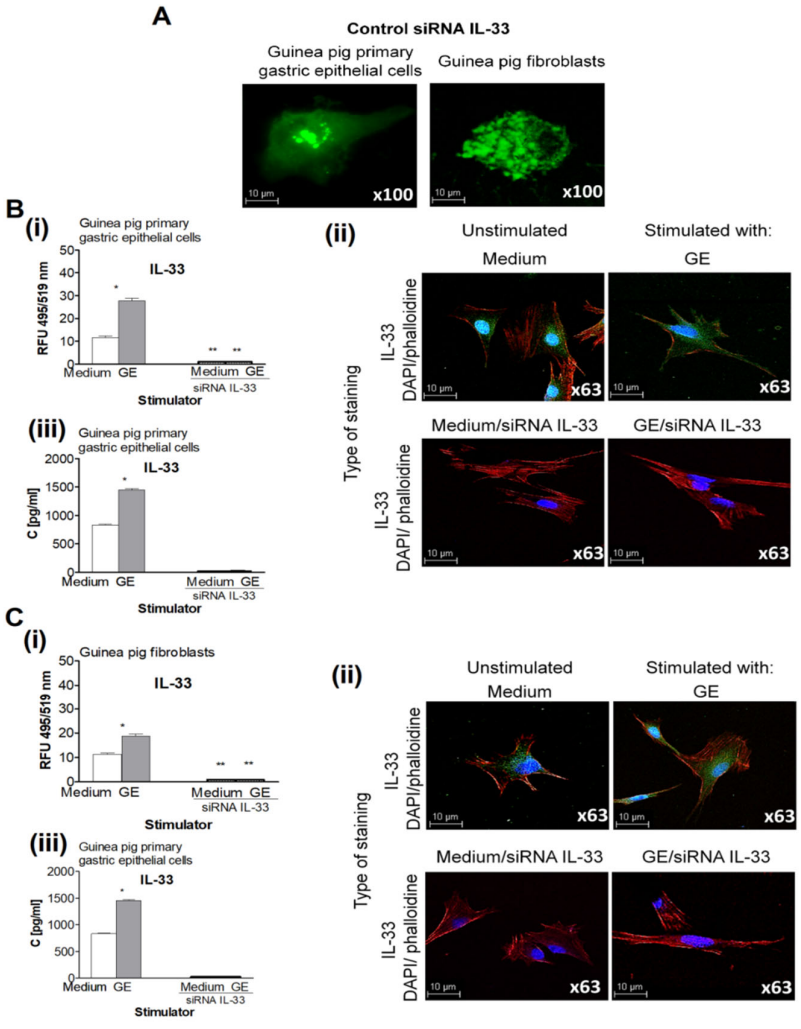


Figure 2. Production of IL-33 in cell cultures exposed to *H. pylori* components. (**A**) Representative images of guinea pig primary gastric epithelial cells or fibroblasts treated with control siRNA-labelled with fluorescein isothiocyanate; green (FITC) and photographed in the confocal microscope (Leica TCS SP Wetzlar, Germany), at magnification ×100. (**B**) Production of IL-33 by the guinea pig primary gastric epithelial cells not transfected or transfected with siRNA IL-33, unexposed or

exposed on *H. pylori* glycine acid extract (GE). (**i**) Level of intracellular IL-33 in the guinea pig primary gastric epithelial cells measured as relative fluorescence units (RFU). (**ii**) Representative images of the guinea pig primary gastric epithelial cells stained for intracellular IL-33 (green) and counterstained with 4′,6-diamino-2-phenylindole (DAPI; blue) or phalloidin –Texas Red™ (red), photographed in the confocal microscope (Leica TCS SP, Wetzlar, Germany), at magnification ×63. (**iii**) Concentration of IL-33 in the supernatants of guinea pig primary gastric epithelial cells estimated by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (**C**) Production of IL-33 by the guinea pig fibroblasts, not transfected or transfected with siRNA IL-33, unexposed or exposed on *H. pylori* GE. (**i**) Level of intracellular IL-33 in the guinea pig fibroblasts measured as relative fluorescence units (RFU). (**ii**) Representative images of the guinea pig fibroblasts stained for intracellular IL-33 (green) and counterstained with DAPI (blue) or phalloidin (red) and photographed in the confocal microscope (Leica TCS SP, Wetzlar, Germany) at x63 magnification. (**iii**) Concentration of IL-33 in supernatants of guinea pig fibroblasts estimated by the ELISA. Results are showed as median with the range of five experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed using the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for *, ** $p < 0.05$,* unstimulated vs. GE stimulated untransfected cells, ** untransfected vs. transfected cells in medium only or in medium with GE.

Cells transfected with siRNA were examined for spontaneous and *H. pylori*-induced cell migration and proliferation in vitro conjunction with the ability to produce IL-33. Primary gastric epithelial cells and fibroblasts cultured in medium only produced the base level of IL-33, whereas cells treated with *H. pylori* GE produced significantly increased amounts of this cytokine, as detected intracellularly and in cell culture supernatants (Figure 2). Importantly, cells transfected with siRNA for IL-33 were not able to produce IL-33, regardless of their exposure to *H. pylori* GE (Figure 2).

2.3.Pro-Regenerative Activity of IL-33 in the Cell Cultures Exposed to H. pylori Components

Injury to the gastric mucosa in individuals infected with *H. pylori* triggers tissue regeneration processes. It was found that interaction between *H. pylori*-derived RpL1aa 2–20 peptide (Hp 2–20) and cellular formyl peptide receptors (FPRs) induces cell migration and proliferation, as well as the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is involved in tissue regeneration [56]. Millar et al., showed that the binding of IL-33 with its secretory receptor (ST2) is necessary for initiation of tissue healing [38]. It has also been suggested that IL-33 is involved in tissue regeneration by activating group 2 innate lymphoid cell (ILC2) to deliver amphiregulin, a protein that is essential for epidermal growth, cell survival and proliferation [57].

In our cellular models, the pro-regenerative activity of cells was evaluated based on cell migration, proliferation and the ability to reduce MTT. As shown in Figure 3A(i), control cells that were not transfected with IL-33 siRNA were able to migrate and minimize any scratches.

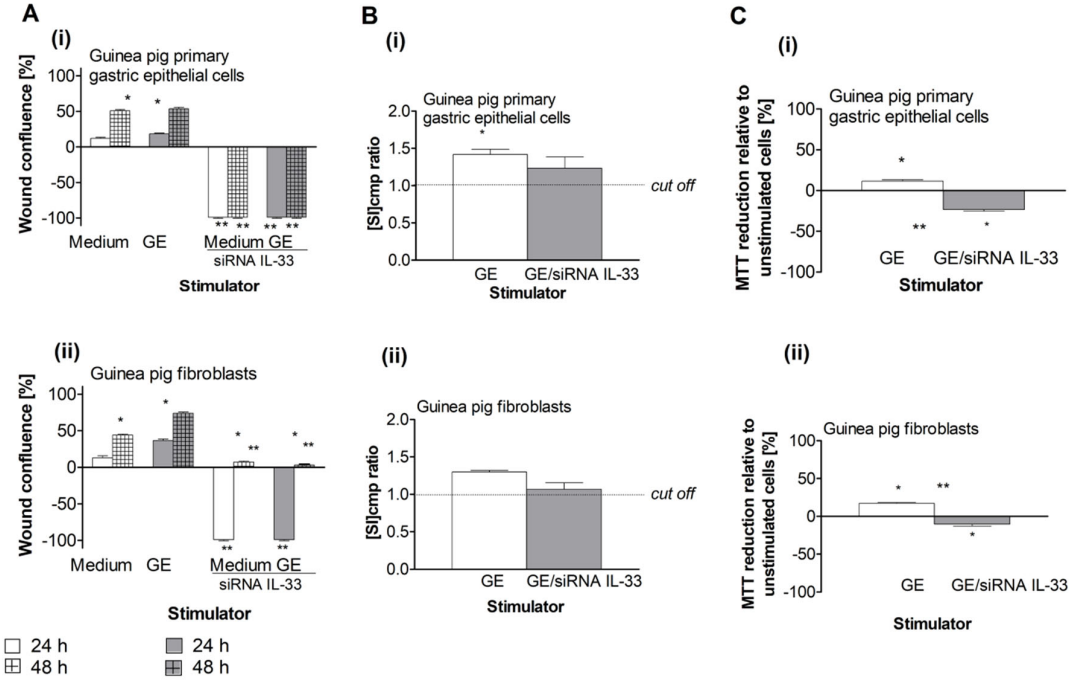


Figure 3. Pro-regenerative activity of IL-33 in the cell cultures exposed to *H. pylori* components. (**A**) Migration effectiveness of the guinea pig primary gastric epithelial cells (**i**) or fibroblasts (**ii**), not transfected or transfected with siRNA IL-33, cultured in medium only or in the milieu of *H. pylori* glycine acid extract (GE), expressed as the percentage of wound confluence in the scratch assay. (**B**) Proliferation of the guinea pig primary gastric epithelial cells (**i**) or fibroblasts (**ii**) untransfected or transfected with siRNA IL-33 in medium only or in the milieu of *H. pylori* GE, estimated in a radioactive assay. Proliferation is shown as stimulation index (SI), which was calculated, expressed as cpm ratio of unstimulated vs GE stimulated cells. (**C**) Metabolic activity of the guinea pig primary gastric epithelial cells (**i**) or fibroblasts (**ii**), not transfected or transfected with siRNA IL-33, expressed as the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by stimulated cells relative to unstimulated cells. Results are showed as a median with a range of five experiments performed in triplicates for each experimental variant. Statistical analysis was performed using the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for *, ** $p < 0.05$, * unstimulated (only medium) vs. GE stimulated, untransfected or tranfected cells, ** untransfected vs. transfected cells in medium only or in medium with GE.

However, the wound healing ability of both types of cells was completely abrogated by siRNA silencing of IL-33, after up to 48 h of cell culture for gastric epithelial cells and up to 24 h of culture for fibroblasts, indicating that IL-33 potentiates cell migration, which is an early step in cell renewal (Figure 3).

Further, we examined the influence of *H. pylori* GE on the migration of cells with and without IL-33 siRNA transfection. Untransfected primary gastric epithelial cells that were treated with *H. pylori* GE migrated as effectively as those cells cultured in medium only, whereas IL-33 siRNA-transfected cells did not migrate in response to GE (Figure 3 A(i)). In comparison, the migration of untransfected fibroblasts was upregulated by GE compared to the movement of cells cultured in medium only. Importantly, cells transfected with IL-33 siRNA were unable to migrate at all (Figure 3A(ii)). These results indicate that the pro-regenerative potential of cells exposed to GE depends on the ability of cells to produce IL-33.

Cell proliferation plays a key role in the later stages of cell renewal. To determine the role of IL-33 driving cell proliferation in the presence of GE, we evaluated the proliferative activity of cells with and without IL-33 siRNA transfection that were unexposed or exposed to *H. pylori* GE. Only

untransfected primary gastric epithelial cells and fibroblasts proliferated in response to GE (Figure 3B(i),B(ii)). The increased GE-induced cell proliferation was related to the increased effectiveness in MTT reduction that was observed in untransfected cells (Figure 3C(i),C(ii)), suggesting that the pro-regenerative activity of IL-33 is due to the upregulation of cell proliferation.

2.4. Control of H. pylori-Induced Erk Activation by IL-33

It has been shown that IL-33 enhances proliferation and invasiveness of decidual stromal cells by upregulating the chemokines CCL2/CCR2 through increasing the phosphorylation of nuclear factor NF-κB p65 and the extracellular signal-regulated kinase Erk [58]. In the present study, the level of phosphorylated Erk was increased in response to GE in primary gastric epithelial cells and fibroblasts that were untransfected or transfected with IL-33siRNA (Figure 4).

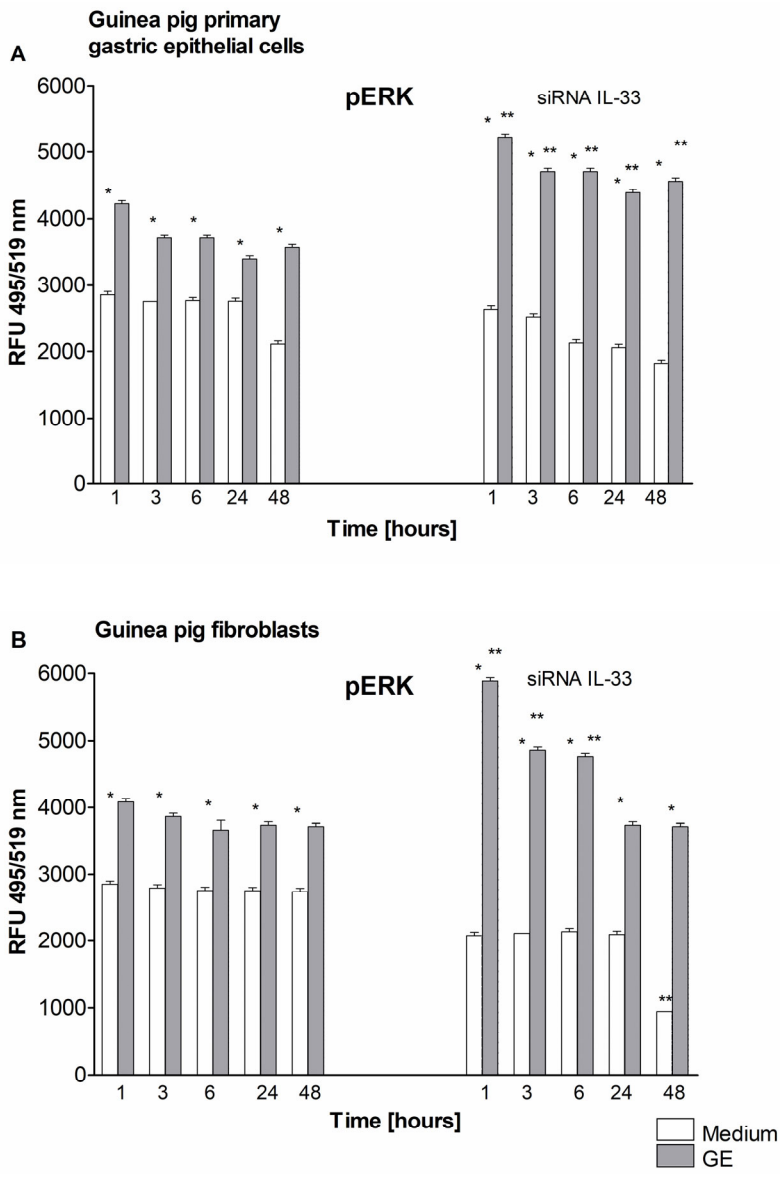


Figure 4. Activation/phosphorylation of Erk. Level of phosphorylated Erk (pERK) detected at time points: 1, 3, 6, 24, 48 h in cell cultures of guinea pig primary gastric epithelial cells (**A**) or fibroblasts (**B**), not transfected or transfected with siRNA IL-33, in medium only or exposed to *H. pylori* glycine acid extract. (GE). Activation of Erk was estimated based on relative fluorescence units (RFU) of cells intracellularly stained for pErk. Fluorescence was measured in a fluorescence reader (Victor 2, Wallac, Oy Turku, Finland) at wavelength: 495 excitation and 519 emission (emission). The results of

four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant are presented. Statistical analysis was performed using the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for *, ** $p < 0.05$, * unstimulated (only medium) vs. GE stimulated untransfected or transfected cells, ** untransfected vs. transfected cells in medium only or in medium with GE.

The level of phosphorylated Erk in IL-33 siRNA-silenced gastric epithelial cells treated with GE was significantly higher than that in untransfected cells (Figure 4A,B). This suggests that GE-induced Erk activation in gastric epithelial cells and fibroblasts is under the control of IL-33. The limitation of these data is associated with the lack of the IL-33 dependent molecular mechanism of Erk control, including the influence of well-defined *H. pylori* components and the inflammatory milieu. Further study in this area can help to better understand these processes.

2.5. Regulation of Cell Apoptosis by IL-33

We further explored whether the decreased migration, MTT reduction, and proliferation of cells transfected with IL-33 siRNA and exposed to *H. pylori* GE was a result of cell apoptosis. Seki et al., showed that IL-33 prevented cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis both in vitro and in vivo and improved cardiac function and survival after myocardial infarction through ST2 (an IL-1 receptor family member) receptor signaling pathway [59]. However, IL-33 is sensitive to degradation and attenuation by effector caspases that are activated during apoptosis (caspase 3 and caspase 7) but is not a physiological substrate for the caspases associated with inflammation (caspase 1, 4 and 5) [60,61]. In our study, approximately 20% of untransfected gastric epithelial cells or fibroblasts cultured for 24 h in medium alone showed evidence of early apoptosis via TUNEL assay, whereas 40% of those cells underwent apoptosis in the GE treatment group (Figure 5).

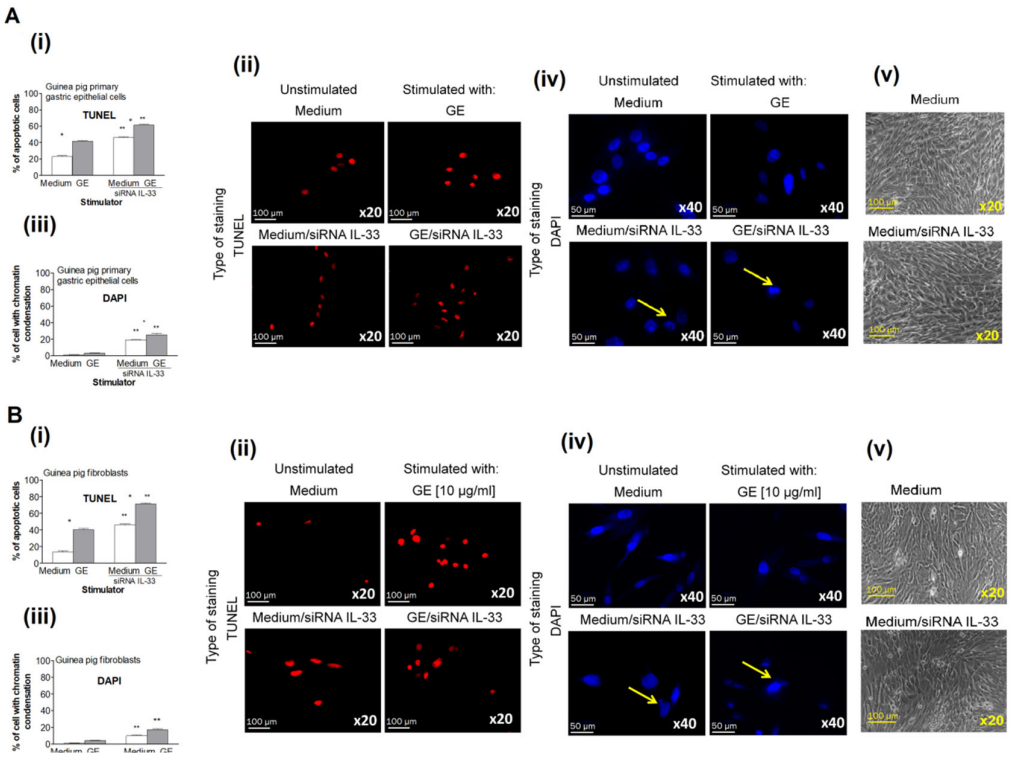


Figure 5. Assessment of apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and 4′,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) nuclear staining. Results for the guinea pig primary gastric epithelial cells (**A**) or fibroblasts (**B**), untransfected or transfected with siRNA, in medium only or exposed to *H. pylori* glycin acid extract) (GE)presented as the percentage of apoptotic cells stained in the TUNEL assay and counted using the Image J software version 1.48v (National Institute of Health, United States) (**i**). (**ii**) Representative images of cells stained in the TUNEL assay (red nuclei) and photographed in the fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany) at wavelengths: 550 nm (excitation) and 590 nm

(emission), at magnification x20. (**iii**) The percentage of cells stained with DAPI, indicating the chromatin condensation. (**iv**) Representative images of cells stained with DAPI (blue nuclei) and photographed in the fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, Germany) at wavelengths: 345 (excitation) and 455 nm (emission), at magnification ×40. (**v**) Representative images of untransfected cells cultured in medium only (medium) or transfected with siRNA IL-33 and cultured in medium only (medium/siRNA IL-33) photographed in the phase-contrast microscope (YS100 Nikon, Tokyo, Japan), at magnification ×20. The results of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant are presented. Statistical analysis was performed using the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for *, ** $p < 0.05$, * unstimulated (only medium) vs. GE stimulated, untransfected or tranfected cells, ** untransfected vs. transfected cells, in medium only or in medium with GE.

Both cell types transfected with IL-33 siRNA had up to a 40% increase in apoptosis, indicating the role of IL-33 in controlling cell growth in medium alone. The percentage of IL-33 siRNA-transfected cells that were exposed to *H. pylori* GE that underwent apoptosis reached 60% and 70% in cell cultures of gastric epithelial cells and fibroblasts, respectively. These results show that GE alone promoted cell apoptosis and that IL-33 downregulated this process. In untransfected cells that were cultured in medium alone, the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL was higher than the expression of proapoptotic caspase 3; moreover, in cell cultures exposed to *H. pylori* GE, the ratio of Bcl-xL to caspase 3 was similar (Figure 6).

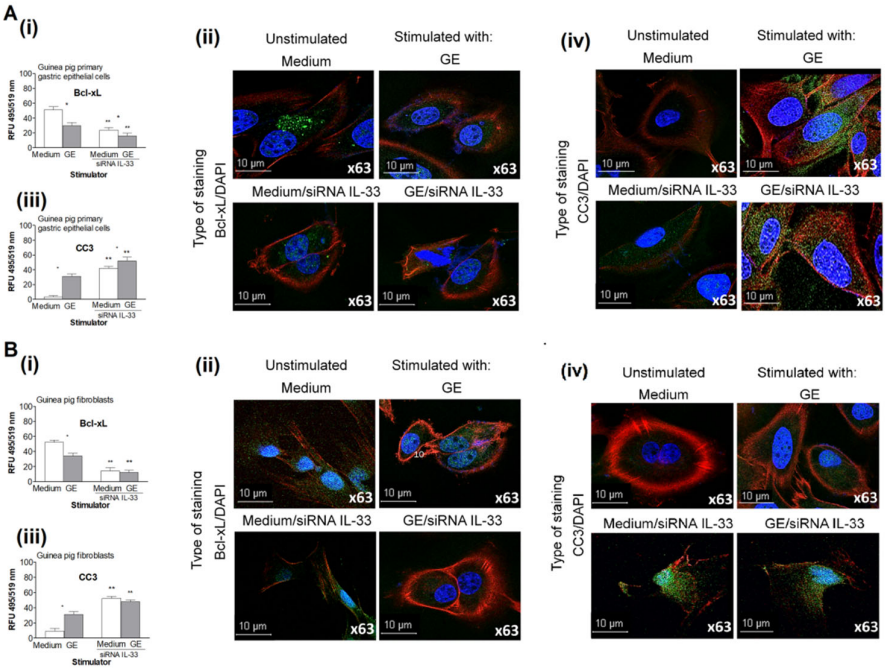


Figure 6. The expression of anti-apoptotic Bcl-xL and cleaved caspase 3 in cell cultures in vitro. Levels of anti-apoptotic Bcl-xL and cleaved caspase 3 (CC3) in cell cultures of guinea pig primary gastric epithelial cells (**A**) or fibroblasts (**B**), untransfected or transfected with siRNA cultured in medium only or exposed to *H. pylori* glycine acid extract (GE).The level of intensity of Bcl-xL (**i**) and CC3 (**iii**) was measured using the Image J software version 1.48v (National Institute of health, United States). Representative images of cells stained for Bcl-xL (**ii**) or CC3 (**iv**) and photographed under 63x magnification in confocal microscope (LeicaTCS SP, Wetzlar, Germany)). 4′,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) was used for nuclear staining and phalloidin –Texas Red™ for cytoskeleton staining. The results of four independent experiments performed in triplicates for each experimental variant are presented. Statistical analysis was performed using the nonparametric U Mann-Whitney test with significance for *, ** $p < 0.05$, * unstimulated (only medium) vs. GE

stimulated, untransfected or tranfected cells, ** untransfected vs. transfected cells in medium only or in medium with GE.

By comparison, in cultures of IL-33 siRNA-silenced cells incubated in medium only or in the presence of *H. pylori* GE, the level of proapoptotic caspase 3 was higher than the level of Bcl-xL (Figure 6A,B). The increased migration and proliferation of untransfected gastric epithelial cells and fibroblasts was possibly related to the ability of these cells to produce IL-33. Our data suggests that IL-33 prevents cell migration and proliferation by downregulating cell apoptosis.

3. Discussion

Colonization of the gastric mucosa by *H. pylori* in humans and in laboratory animals experimentally infected with *H. pylori* induces a chronic inflammatory response and injury to gastric tissue, which become massively infiltrated by immune cells to eliminate the infection and restore homeostasis. However, this excessive activation of immunocompetent cells may increase *H. pylori*-induced deleterious effects [62,63]. According to the "theory of danger", necrotic cells release signaling molecules with adjuvant properties that activate innate immune cells and contribute to the development of specific adaptive immunity [47,64,65]. Emergency mediators are also released by apoptotic cells if these factors are not removed by phagocytes, which may occur during *H. pylori* infection, since *H. pylori* components downregulate phagocytotic processes and induce cell apoptosis in vivo and in vitro [66–68]. In the gastric mucosa of patients infected with *H. pylori*, during the acute phase of infection, enhanced expression of IL-33 suggests the role of this cytokine in activating immune cells and controlling gastric tissue homeostasis [51]. Further experiments are needed to specify the role of IL-33 during *H. pylori* infection.

In the present study, we asked whether *H. pylori*-induced gastric inflammation in guinea pigs that were experimentally infected with *H. pylori* correlated with the increased production of IL-33 and whether this cytokine was capable of promoting migration and proliferation of primary guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts in vitro.

The present study revealed that *H. pylori* in vivo and *H. pylori* components in vitro increased the production of IL-33. In response to *H. pylori*-induced gastric barrier injury, IL-33 may play a beneficial role in cell regeneration processes. However, excessive cell proliferation increases the risk of amplification of defective cells. In this case, the anti-apoptotic activity of IL-33 in gastric tissue exposed to carcinogenic *H. pylori* infection can be deleterious to the host due to promotion of neoplasia [6]. Krzysiek-Maczka et al. showed that *H. pylori* induces the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, increases expression of early carcinogenic markers such as hypoxia inducible factor (HIF)-1α and decreases expression of proapoptotic Bax [69]. Cell apoptosis may be considered as a mechanism for controlling the excessive proinflammatory activity of IL-33 bydelivering proapoptotic caspase-3, which can inactivate IL-33 [61]. Krzysiek-Maczka et al., have suggested that the over expression of heat shock protein Hsp-70 and the unchanged proliferation of fibroblasts in the gastric mucosa represent the enhanced protective activity of *H. pylori*-infected cells in maintaining their own integrity under inflammatory properties of these bacteria and bacterial-mediated cytotoxicity [69]. Previously, we showed that seven days after *H. pylori* inoculation of guinea pigs, the number of gastric tissue cells undergoing apoptosis was higher than that at 28 days after inoculation, which corresponded to acute and chronic infection, respectively. This was in line with an increased expression of antiapoptotic Bcl-xL in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected guinea pigs after 28 days following inoculation [55]. In the present study, cells exposed to *H. pylori* GE responded by increasing apoptosis (Figure 5), which was correlated with an increased production of proapoptotic caspase 3 (Figure 6). In our previous study, which was carried out in an in vivo model of *H. pylori*-infected guinea pigs, increased production of metalloproteinase (MMP)-9 was detected, both locally and systemically [55]. Similarly, guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts exposed to *H. pylori* components in vitro responded by producing MMP-9 [55]. Our study showed that the level of phosphorylated Erk was increased in response to GE in primary gastric epithelial cells and fibroblasts (Figure 4A,B). Interestingly, the level of phosphorylated Erk in

IL-33 siRNA-silenced gastric epithelial cells treated with GE was even higher than that in untransfected cells (Figure 4A,B), suggesting that GE-induced Erk activation in gastric epithelial cells and fibroblasts was under the control of IL-33. The increased activation of Erk in IL-33 siRNA-silenced cells observed in this study was potentially induced by MMP-9. Further study is needed to investigate whether IL-33 governs MMP-9 production.

In vivo, the concentration and activity of IL-33 can be modulated by the soluble IL-33 receptor ST2, which is delivered by fibroblasts and macrophages in response to bacterial LPS, as well as TNF-α, IL-1, or cytokines produced by Th2 lymphocytes. ST2 can form a complex with SIGIRR (Toll IL-1R8) and inhibit the biological activity of IL-33 [46]. It has been shown in *IL-33*−/− and *IL-33*+/+ mice that IL-33 deficiency leads to delayed local inflammation by reducing neutrophil chemoattractant factors, resulting in delayed resolution of tissue damage during dextrin sodium sulfate-induced colitis [61]. The promotion of gastric epithelial cell apoptosis by *H. pylori* components, particularly LPS, may be a part of these destructive processes that increase gastric barrier permeability [67]. Yi et al., showed that LPS from *E. coli* induces a pathologic increase in lung vascular leakage under septic conditions due to increased apoptosis of microvascular endothelial cells [70]. Recently, increased permeability of in vitro monolayers of human gastric epithelial cells and endothelial cells in response to *H. pylori* LPS was observed in conjunction with elevated apoptosis [71].

Shibata et al., revealed that TNF-α, which is released by immunocompetent cells in patients with *H. pylori* infection, can promote cell apoptosis in the gastric mucosa. On the other hand, the amount of soluble TNF receptors (sTNF-Rs), which are expressed in the gastric mucosa, is significantly increased in *H. pylori*-positive patients, resulting in protection of gastric epithelial cells from TNF-α-induced apoptosis during *H. pylori* infection [72]. Due to this, the examination of sTNF-Rs as potential TNF-α modulators should be considered. In our guinea pig models~~,~~ the concentration of systemic TNF-α in *H. pylori*-infected guinea pigs was lower than that in control animals.

Upregulation of programmed cell death during *H. pylori* infection can help to reduce microbial infection, separate infected cells from uninfected cells, eliminate mutated cells, and stimulate the immune system to attack the pathogen. However, upregulation of cell apoptosis may delay the process of tissue regeneration, particularly when the elimination of apoptotic cells is insufficient. During *H. pylori* infection, this could be due to *H. pylori*-induced diminished phagocyte activity [66,68]. Excessive cell apoptosis may also promote a chronic inflammatory response, which is potentially deleterious for the host.

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Statement

In vivo experiments were developed according to the EU directive (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33–79)), and were approved by the resolution of the Local Ethics Committee (LKE9) for Animal Experiments of the Medical University of Lodz, Poland, which was established by the Ministry of Science and Higher Education in Poland (Decision 58/ŁB45/2016).

4.2. H. pylori Infection in Caviae porcellus (Guinea Pigs)

Three-month-old, male Himalayan guinea pigs (400–600 g), free of pathogens, were housed in the Animal House at the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz (Poland), kept in cages with free access to drinking water and fed with standard chow. The animals were inoculated per os with an *H. pylori* suspension as previously described [31,73]. Until day 7 or day 28 after inoculation, the health of the animals was monitored every day (body weight, water and food intake, behavioral symptoms, skin and fur condition, and diarrhea). Seven and 28 days after the last *H.* pylori inoculation, the animals were euthanized with an overdose of sodium barbiturate

(Morbital, Biowet, Puławy, Poland), and the gastric tissue was collected for analyses, whereas blood samples were processed to obtain serum and then stored at −80 °C. *H. pylori* infection was confirmed by microscopic imaging of *Helicobacte*r-like organisms (HLOs), scoring tissue inflammation in thin layer preparations stained by routine histological staining, polymerase chain reaction (PCR) to detect *H. pylori cagA* and *ureC* gene sequences, and the laboratory enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for anti-*H. pylori* IgG antibodies as previously described [55]. *H. pylori* bacteria were also visualized in gastric tissue specimens stained specifically with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-*H. pylori* antibody (MyBiosource, San Diego, CA, USA) diluted 1:200 and photographed with a confocal microscope (Leica TCS SP, Wetzlar, Germany), at magnifications of 10× and 40×. In total, 15 animals were used in the study: 5 control uninoculated animals and 10 animals infected with *H. pylori* (5–7 days infection and 5–28 days infection).

4.3. Cell Cultures

Primary guinea pig gastric epithelial cells were obtained as previously described [54]. Briefly, the stomach was isolated from the guinea pig, homogenized and treated with 0.25% trypsin (BIOMED-LUBLIN, Lublin, Poland) for 15 min at room temperature. The cell suspension at a density of 2×10^6 cells/mL was seeded onto a 6-well plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA) and cultured for 24 h (5% CO_2, 37 °C) to allow the cells to adhere. The cells were cultured in a mixture of DMEM and Ham's F-12 media (ratio 1:1; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mi, USA), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane sulfonicacid) (HEPES), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), amphotericin B (0.025 µg/mL), L-glutamine (2 mM/mL)epidermal growth factor (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) 0.01 µg/mL and 0.005% dexamethasone. The guinea pig fibroblasts (CRL-1405) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Manassas, VA, USA) The cells were routinely grown as a monolayer in complete RPMI-1640 medium cRPMI(Sigma St. Louis, MI, United States) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.Every 2–3 days, the medium was changed and the cells were passaged at 80–90% confluence.

4.4. Bacterial Stimuli

Glycine acid extract (GE) containing surface antigens from the reference *H. pylori* strain CCUG 17874 was obtained by extraction with 0.2 mol/L glycine buffer, pH 2.2, as previously described [74]. The protein composition was evaluated by SDS-PAGE and Western blotting (Milenia® Blot *H. pylori*, DPC Biermann, GmbH, Bad Nauheim, Germany) with reference serum samples from patients infected with *H. pylori* [75]. The major proteins in GE that were recognized by sera from *H. pylori*-infected patients were: 120 kDa (CagA), 87 kDa (VacA), 66 kDa (UreB), 60 kDa (Hsp), 29 kDa (UreA), and 22–26kDa. The GE protein concentration was 600 µg/mL (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltman, WY, United States), which was adjusted to 10 µg/mL for experiments. The GE contained <0.001 EU/mL of LPS, as shown by the chromogenic Limulus amebocyte lysate test (Lonza, Braine-Alleud, Belgium). The antigen concentrations were adjusted experimentally or adopted from previously performed experiments [27,28,31,32,67].

4.5. IL-33 siRNA Silencing

Primary guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts were seeded on 6-well plates containing glass coverslips at the density of 5×10^5 cells/well in 1 mL of RPMI-1640 or F12:DMEM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), both antibiotic free, supplemented with 10% FCS and cultured until complete confluence (37 °C, 5%CO_2). Next, the cells were transfected with theIL-33 siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) according the manufacturer's protocol. Briefly, the cells were washed with transfection medium and then incubated with the transfection mixture containing IL-33siRNA, siRNA transfection reagent, and siRNA transfection medium for 6 h (37 °C, 5%CO_2). After 6 h, the cells were supplemented with culture medium and incubated until they were used (within 24 h). Then, the cells were stimulated for 24 h with *H. pylori* GE or medium

only. Control FITC-conjugated siRNA was used to calculate the efficiency of transfection (percentage of positively transfected cells). A minimum of 100 cells was analyzed. Moreover, the effectiveness of silencing (IL-33 production) was confirmed in cell culture supernatants by ELISA (MyBiosource, San Diego, CA, USA) or intracellularly using microscopy and rabbit polyclonal primary anti-IL-33 antibodies (Thermo Fisher Scientific, Waltam, MA, USA) followed by secondary FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Boster Bio,Pleasanton, CA,USA). Cell nuclei were visualized with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich,Saint Louis, MI, USA),). Stained samples were viewed using a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope, A1,Jena, Germany) at appropriate wavelengths (FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm) and DAPI (358 nm excitation, 461 nm emission) at 200× magnification, and the fluorescence intensity was measured using ImageJ software version 1.48v (National Institute of Health,Bethesda,MD, USA). Four independent experiments were carried out with three replicates for each experimental variable.

4.6. Evaluation of Cell Migration in a Scratch Wound Healing Assay

Cell migration was evaluated in vitro by a scratch wound assay using primary gastric epithelial cells or fibroblasts with and without IL-33 siRNA silencing that were untreated or treated with *H. pylori* GE antigenic complex, as previously described [67]. The cells were seeded on 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well in 1 mL of cRPMI-1640 or cF12:DMEM medium, supplemented with 2% FCS and 1% penicillin and streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), and cultured until complete confluence. Next, the cell monolayers were scratched with a sterile 200 μL pipette tip (designated as time 0 of wound repair), and then *H. pylori* GE was added to the cells. Twenty-four hours later, the *H. pylori* components were removed, and the cells were washed twice with culture medium. Wound images were taken at 0, 24, and 48 h by a digital camera (Nikon P20, Tokyo, Japan). The scratched areas were measured using ImageJ software version 1.48v (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Each wound was measured four times. Wound healing in the presence of the bacterial components is expressed as a percentage of cells migrating to the wound zone in comparison to that of the untreated cells. Four independent experiments were carried out with three replicates for each experimental variable.

4.7. Cell Viability Assays

Metabolic activity of untransfected or IL-33 siRNA-transfected cells that were untreated or treated with *H. pylori* components was evaluated colorimetrically using thetetrazolium yellow dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), which is reduced by living cells to yield soluble purple formazan crystals, as previously described [67]. Absorbance at 570 nm was estimated with a Victor 2 plate reader (Wallac, Oy, Turku, Finland). The results of at least four independent experiments performed in triplicate for each experimental variable are presented as the median percentage with the range, relative to untreated cells. The effectiveness of MTT reduction was calculated based on the following formula:

$$\text{MTT reduction relative to untreated cells (\%)} = (\text{absorbance of treated cells/absorbance of untreated cells} \times 100\%) - 100\%$$

The ability of cells to proliferate was examined by a radioactive proliferation assay based on the measurement of tritiated thymidine (3H-TdR) incorporated during DNA synthesis as previously described [67]. The incorporation of thymidine was measured using a MicroBeta 2 scintillation counter (Wallac Oy, Turku, Finland) after harvesting the cells on fiber filters. The results are expressed as median counts per minute (cpm)/culture with the range. Four independent experiments were performed in triplicate. The stimulation index (SI), expressed as the relative cpm ratio, was calculated by dividing the counts/min for the cell cultures with stimulation by the cpm counts/min for the cell cultures without stimulation. SI values higher than 1.0 (cut-off) were considered to be a positive result in the proliferation assay.

4.8. Cell Apoptosis

Apoptosis of untransfected or IL-33 siRNA-transfected primary guinea pig gastric epithelial cells and fibroblasts was evaluated by TUNEL assay (Cell Meter™ TUNEL apoptosis assay kit, AAT Bioques, Sunnyvale, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after 24 h of stimulation with *H. pylori* GE or culture in medium only, the cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.02% TritonX-100 in PBS and stained with Tunnelyte™ red dye diluted 1:100 for 1 h at 37 °C and 5% CO_2. The cell nuclei were counterstained with Hoechst stain (Cell Meter™ TUNEL apoptosis assay kit, AAT Bioques, Sunnyvale, USA) diluted 1:1000 in PBS for 15 min at room temperature. Cells with apoptotic changes were imaged using a fluorescence microscope (Zeiss, AxioScope, A1, Jena, Germany) at a wavelength of 550 nm (excitation) and 590 nm (emission) and a magnification of 20/40×. Four independent experiments were carried out with three replicates for each experimental variable. Furthermore, cells that were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS were stained overnight at 4 °C with primary anti-Bcl-xL antibodies or with primary anti-cleaved Caspase 3 antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), diluted 1:500 in 1% BSA/PBS, followed by incubation with FITC-conjugated secondary antibodies (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) diluted 1:2000 in 1% BSA/PBS. Cell nuclei were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich,Saint Louis, MI, USA),) diluted 1:1000 in PBS for 15 min at room temperature. Stained cells were observed in fluorescent microscope at appropriate wavelengths: FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm) and DAPI (excitation358 nm, emission461 nm) at 1000× magnification. Fluorescence intensity was measured using ImageJ software version 1.48v via the fluorescence microscope [76] (Zeiss, Axio Scope, A1, Jena, Germany) Four independent experiments were carried out in three replicates for each experimental variable.

4.9. Erk Activation/Phosphorylation (pErk)

Primary gastric epithelial cells and fibroblasts were placed on 96-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Waltam, MA, USA) at a density of 1×10^5 cells/well (volume 100 µl) in DMEM:F12 or RPMI-1640 medium, respectively (37 °C, 5% CO_2). Unstimulated (control) or *H. pylori* GE-stimulated cells (concentration 10 µg/mL) were incubated for 1, 3, 6, 24, and 48 h, fixed with 4% formaldehyde solution for 20 min, and then washed 3 times in PBS, followed by incubation with 0.02% TritonX-100 for 10 min to permeabilize the membranes. Next, the cells were incubated with 3% BSA in PBS to block nonspecific binding and with primary rabbit anti-phospho-Erk 1/2 (Thr202/Tyr204)antibody(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)) at a 1:200 dilution, followed by incubation with FITC-conjugated chicken anti-rabbit secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltam, MA, USA). Three independent experiments were performed in triplicate. Erk activation was assessed quantitatively based on the green fluorescence intensity that was measured using a multifunctional Victor 2 reader (Wallac, Oy, Turku, Finland) at the following wavelengths for FITC: 495 nm (excitation) and 519 nm (emission).

4.10. Statistical Analysis

All values are expressed as the median values with a range. The differences between tested variables were assessed using Statistica 12 PL software with a nonparametric Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

5. Conclusions

In the light of the results obtained in this study, increased production of IL-33 in response to *H. pylori* and components of this bacterium could be considered as an important host mechanism promoting gastric tissue renewal due to IL-33-induced cell migration and proliferation and downregulation of *H. pylori*-induced cell apoptosis. This indicates that IL-33 may play a beneficial role in cell regeneration processes during *H. pylori* infection. However, excessive cell proliferation increases the risk of amplification of defective cells. In such cases, upregulation of anti-apoptotic

activity of IL-33 in gastric tissue exposed to carcinogenic *H. pylori* potentially can promote gastric neoplasia (Figure 7).

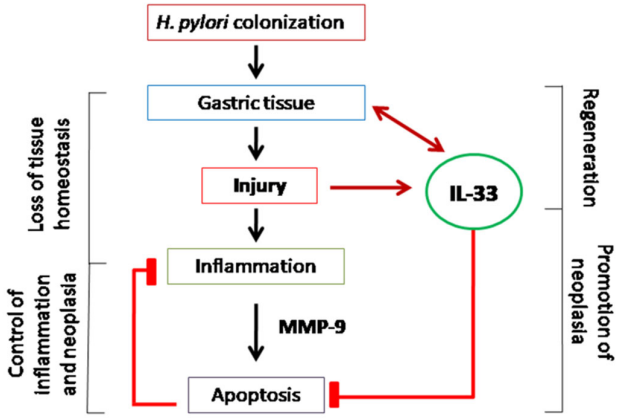


Figure 7. Possible mechanisms of IL-33 in *H. pylori*-induced pathogenesis.

Figure 7 visualizes the possible mechanisms of IL-33 in *H. pylori* induced pathogenesis. Thus, colonization of gastric mucosa with *H. pylori* results in tissue injury and loss of local homeostasis. These events upregulate secretion of IL-33, which alarms the host immune system. Activated immune cells deliver MMP-9, which promotes apoptosis of gastric epithelial cells. Enhancement of apoptosis may help to control inflammatory response and amplification of defective cells. Moreover, loss of gastric epithelial cells should be replenished to prevent the gastric barrier integrity. In this case, increased secretion of IL-33 in the gastric tissue colonized with *H. pylori* seems to be correlated with regeneration processes due to downregulation of apoptosis. However, such IL-33 activity may potentially promote the development of gastric cancer induced by *H. pylori* infection.

Author Contributions: Conceptualization, W.G. and M.C.; methodology, W.G., A.K.; validation, W.G., A.K.; formal analysis, W.G., A.K., M.C.; investigation, W.G., A.K., M.C.; data curation, W.G., A.K., writing—original draft preparation, W.G., A.K., M.C.; visualization, W.G.; supervision, M.C.; writing—review and editing, W.G., A.K., M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: "This research was funded by statutory financing of Department of Immunology and Infectious Biology The Faculty of Biology and Environmental Protection, provided by the Rector of University of Lodz".

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Acknowledgements: The experiments were partly performed using equipment of the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Poland.

Abbreviations

Bcl-xL	B cell lymphoma-extra large
BSA	Bovine serum albumin
CagA	Cytotoxin-associated gene A
CC3	Cleaved caspase 3
cRPMI	Complete RPMI
dsDNA	Double-stranded DNA
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4′,6-diamino-2-phenylindole
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Featal calf serum
FPRs	Formyl peptide receptors

GE	Glycine acid extract
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidase
HEPES	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane sulfonicacid
HIF	Hypoxia inducible factor
HLO	Helicobacter like organism
HMGB-1	High motility group box-1 protein
HP-NAP	Neutrophil-activating factor
Hsp	Heat shock protein
HtrA	High temperature requirement A protein
IL	Interleukin
ILC2	Group 2 innate lymphoid cell
Le	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MMP	Metalloproteinase
MUC5AC	Mucin 5
MTT	3-4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NFkB	Nuclear factor B
NLRs	Nod-like receptors
PCR	Polimerase chain reaction
pERK	Activation/phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase
PPRs	Pathogen recognition receptors
RFU	Relative fluorescence units
SI	Stimulation index
siRNA	Small interfering RNA
ST2	Secretory receptor
sTNF-Rs	Soluble TNF receptors
TH2	T helper 2
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
VacA	Vacuolating cytotoxin A
VEGF	Vascular endothelial growth factor

References

1. Tarnawski, A. Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair. In Bioregulation and Its Disorders in Gastrointestinal, Tract ed.; *Blackwell Science Japan: Tokyo,* **1998**; . 3–17.
2. Terrés, A.M.; Pajares, J.M.; Hopkins, A.M.; Murphy, A.; Moran, A.; Baird, A.W.; Kelleher D. *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. *Infect. Immun*. **1998**, 66, 2943–2950.
3. Tarnawski, A.S.; Ahluwalia, A.; Jones, M.K. The mechanisms of gastric mucosal injury: Focus on microvascular endothelium as a key target. *Curr. Med. Chem*. **2012**, 19, 4–15, doi:10.2174/092986712803414079.
4. Laine, L.; Takeuchi, K.; Tarnawski, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology*. **2008**, 135, 41–60, doi:10.1053/j.gastro.2008.05.030.
5. Henriksnäs, J.; Phillipson, M.; Storm, M.; Engstrand, L.; Soleimani, M.; Holm, L. Impaired mucus-bicarbonate barrier in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, 291, G396–G403.
6. Goh, K.L.; Chan, W.K.; Shiota, S.; Yamaoka, Y. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter*. **2011**, 16 (Suppl. S1), 1–9, doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00874.x.
7. Blaser, M.J.; Atherton, J.C. *Helicobacter* infection persistence: biology and disease. *J. Clin. Investig*. **2004**, 113, 321–333, doi:10.1172/JCI20925.
8. Chmiela, M.; Michetti, P. Inflammation, immunity, vaccines for Hel*icobacter infection. Helicobacter.* **2006**, 11 (Suppl. S1), 21–26

9. . Peek, R.M.; Crabtree, J.M. *H. pylori* infection and gastric neoplasia. *J. Pathol.* **2006**, 208, 233–248, doi:10.1002/path.1868.
10. Posselt, G.; Backert, S.; Wessler, S. The functional interplay of *H. pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun. Signal*. **2013**, 11, 77, doi:10.1186/1478-811X-11-77.
11. Suzuki, N.; Murata-Kamiya, N.; Yanagiya, K.; Suda, W.; Hattori, M.; Kanda, H.; Bingo A.;Fujii Y,; Maeda S,; Koike K.; et al. Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the *H. pylori* CagA oncoprotein. *Sci. Rep*. **2015**, 5, 10024, doi:10.1038/srep10024.
12. Chmiela, M.; Karwowska, Z.; Gonciarz, W.; Allushi, B.; Stączek, P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J. Gastroenterol*. **2017**, 23, 1521–1540, doi:10.3748/wjg.v23.i9.1521.
13. Rudnicka, K.; Backert, S.; Chmiela, M. Genetic polymorphisms in inflammatory and other regulators in gastric cancer: Risks and clinical consequences. Molecular Mechanisms of Inflammation: Induction, Resolution and Escape by *Helicobacter pylori. Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **2019**, 421, doi:10.1007/978-3-030-15138-6_3.
14. Kusters, J.G.; van Vliet, A.H.; Kuipers, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev*. **2006**, 19, 449–490.
15. Chmiela, M.; Kupcinskas, J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. **2019**, 24 (Suppl. S1), e12638, doi:10.1111/hel.12683.
16. Lytton, S.D.; Fischer, W.; Nagel, W.; Haas, R.; Beck, F.X. Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occluding processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology*. **2005**, 155, 3267–3276, doi:10.1099/mic.0.28049-0.
17. Backert, S.; Kwok, T.; Schmid, M.; Selbach, M.; Moese, S.; Peek, R.M. Jr.;KönigW.; MeyerTF.;Jungblut P.R.Subproteomes of soluble and structure-bound *H. pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* **2005**, 5, 1311–3345, doi:10.1002/pmic.200401019.
18. Cover, T.L.; Blanke, S.R. H. pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol*. **2005**, 3, 320–332, doi:10.1038/nrmicro1095.
19. Palframan, S.L.; Kwok, T.; Gabriel, K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, 2, 92, doi:10.3389/fcimb.2012.00092.
20. Yahiro, K.; Satoh, M.; Nakano, M.; Hisatsune, J.; Isomoto, H.; Sap, J.; Suzuki H.; NomuraF.; Noda M.; Moss J.; et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *H. pylori* VacA. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 31104–31115, doi:10.1074/jbc.M112.387498.
21. Hoy, B.; Löwer, M.; Weydig, C.; Carra, G.; Tegtmeyer, N.; Geppert, T.; Schröder P.;Sewald, N.;Backert S.; Schneider G.; et al. *H. pylori* Htr is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep.* **2010**, 11, 798–804, doi:10.1038/embor.2010.114.
22. Muotiala, A.; Helander, I.M.; Pyhälä, L.; Kosunen, T.U.; Moran, A.P. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect. Immun*. **1992**, 60, 1714–1716.
23. Moran, A.P.; Helander, I.M.; Kosunen, T.U. Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides. *J. Bacteriol*. **1992**, 174, 1370–1377.
24. Moran, A.P.; Aspinall, G.O. Unique structural and biological features of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *Prog. Clin. Biol. Res*. **1998**, 397, 37–49.
25. Appelmelk, B.J.; Simoons-Smit, I.; Negrini, R.; Moran, A.P.; Aspinall, G.O.; Forte, J.G.; DeVries T.; Quan H.;Verboom T.; Maaskant J.J.;et al. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect. Immun*. **1996**, 64, 2031–2040.
26. Paziak-Domańska, B.; Chmiela, M.; Jarosińska, A.; Rudnicka, W. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infection. *Cell. Immunol*. **2000**, 202, 136–139, doi:10.1006/cimm.2000.1654.
27. Grebowska, A.; Moran, A.P.; Bielanski, W.; Matusiak, A.; Rechcinski, T.; Rudnicka, K.; Szczęsna E.; Walencka M.; Rudnicka W.; Chmiela M. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocyte cultures. *J. Physiol. Pharmacol*. **2010**, 61, 437–442.
28. Grebowska, A.; Moran, A.P.; Matusiak, A.; Bak-Romaniszyn, L.; Czkwianianc, E.; Rechciński, T.; Walencka M.; Płaneta-Małecka I.;Rudnicka W.; Chmiela M.Anti-phagocytic activity of *Helicobacter pylori*

lipopolysaccharide (LPS)-possible modulation of the innate immune response to these bacteria. *Pol. J. Microbiol*. **2008**, 57, 185–192.

29. Chmiela, M.; Miszczyk, E.; Rudnicka, K. Structural modifications of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: An idea for how to live in peace. *World J. Gastroenterol.* **2014**, 20, 9882–9897, doi:10.3748/wjg.v20.i29.988
30. Rudnicka, K.; Miszczyk, E.; Matusiak, A.; Walencka, M.; Moran, A.P.; Rudnicka, W.; Chmiela M. *Helicobacter pylori*-driven modulation of NK cell expansion, intracellular cytokine expression and cytotoxic activity. *Innate Immun*. **2015**, 21, 127–139, doi:10.1177/1753425913518225.
31. Miszczyk, E.; Walencka, M.; Rudnicka, K.; Matusiak, A.; Rudnicka, W.; Chmiela, M. Antigen-specific lymphocyte proliferation as a marker of immune response in guinea pigs with sustained *Helicobacter pylori* infection. *Acta Biochim. Pol.* **2014**, 61, 295–303.
32. Mnich, E.; Gajewski, A.; Rudnicka, K.; Gonciarz, W.; Stawerski, P.; Hinc, K.; Obuchowski M.; Chmiela M.Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *Helicobacter pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion. *Acta Biochim. Pol*. **2015**, 62, 641–650, doi:10.18388/abp.2015_1045.
33. Shi, Y.; Evans, J.E.; Rock, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* **2003**, 425, 516–521, doi:10.1038/nature01991.
34. Kono, H.; Rock, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8, 279–298, doi:10.1038/nri2215.
35. Roussel, L.; Erard, M.; Cayrol, C.; Girard, J.P. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* **2008**, 9, 1006–1012, doi:10.1038/embor.2008.145.
36. Lűthi, A.U.; Cullen, S.P.; McNeela, E.A.; Duriez, O.P.J.; Afonina, I.S.; Sheridan, C.; Brumatti G.; Taylor R.C.; Kersse K.;Vandenabeele P.; et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* **2009**, 31, 84–98, doi:10.1016/j.immuni.2009.05.007.
37. Ali, S.; Nguyen, D.Q.; Falk, W.; Martin, M.U. Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2010**, 91, 512–516, doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.107.
38. Millar, N.L.; O'Donnell, C.; McInnes, I.B.; Brint, E. The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol*. **2017**, 61, 41–50, doi:10.1016/j.semcdb.2016.08.007.
39. Ohno, T.; Oboki, K.; Morita, H.; Kajiwara, N.; Arae, K.; Tanaka, S.; Ikeda M, Iikura M,;Akiyama T.; Inoue J.; et al. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS ONE.* **2011**, 6, e18404, doi:10.1371/journal.pone.0018404.
40. Ivanov, V.N.; Zhou, H.; Ghandhi, S.A.; Karasic, T.B.; Yaghoubian, B.; Amundson, S.A.; Hei T.K. Radiation-induced bystander signaling pathways in human fibroblasts: A role for interleukin-33 in the signal transmission. *Cell. Signal*. **2010**, 22, 1076–1087, doi:10.1016/j.cellsig.2010.02.010.
41. Modofsky, A.B.; Savage, A.; Locksley, R.M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury and inflammation. *Immunity.* **2015**, 42, 1005–1019, doi:10.1016/j.immuni.2015.06.006.
42. Espinassous, Q.; Garcia-de-Paco, E.; Garcia-Verdugo, I.; Synguelakis, M.; von Aulock, S.; Sallenave, J.M.; McKenzie A.N.; Kanellopoulos J. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J. Immunol*. **2009**, 183, 1446–1455, doi:10.4049/jimmunol.0803067.
43. Caselli, C. Inflammation in cardiac disease: Focus on interleukin-33/ST2 pathway. *Inflamm. Cell Signal.* **2014**, 1, 118–151, doi:10.14800/ics.149.
44. Miller, A.M. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J. Inflamm*. **2011**, 8, 22, doi:10.1186/1476-9255-8-22.
45. Liu, X.; Hammel, H.; He, Y.; Tainer, J.A.; Jeng, U.S.; Zhang, L.; Wang, S.; Wang S.; Wang X. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptor. *PNAS.* **2013**, 110, 14918–14923, doi:10.1073/pnas.130865111.0.
46. Pastorelli, L.; De Salvo, C.; Vecchi, M.; Pizarro, T.T. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. *Mediators Inflamm*. **2013**, 608187, doi:10.1155/2013/608187.
47. Lopetuso, H.; Scaldaferri, F.; Pizarro, T.T. Emerging role of the interleukin (IL)-23/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenes. Tissue Repair.* **2012**, 5, 18–29, doi:10.1186/1755-1536-5-18.
48. Jovanovic, I.; Radosavljevic, G.; Mitrovic, M.; Juranic, V.L.; McKenzie, A.N.; Arsenijevic, N.; Jonjic S.;Lukic M.L. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur. J. Immunol*. **2011**, 41, 1902–1912, doi:10.1002/eji.201141417.

49. Kuroiwa, K.; Arai, T.; Okazaki, H.; Minota, S.; Tominaga, S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 284, 1104–1102, doi:10.1006/bbrc.2001.5090.
50. López-Casado, M.A.; Lorite, P.; Palomeque, T.; Torres, M.I. Potential role of the IL-33/ST2 axis in celiac disease. *Cell. Mol. Immunol*. **2015**, 1, 282–285, doi:10.1038/cmi.2015.85.
51. Buzelli, J.N.; Chalinor, H.V.; Pavlic, D.I.; Sutton, P.; Menheniott, T.R.; Giraud, A.S.; Judd L.M. IL-33 is a stomach alarmin that initiates a skewed Th2 response to injury and infection. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol*. **2015**, 1, 203–221, doi:10.1016/j.jcmgh.2014.12.003.
52. Smith, M.F.; Mitchell, A.; Li, G.; Ding, S.; Fitzmaurice, A.M.; Ryan, K.; Crowe S.; Goldberg J.B. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5 but not TLR4, are required for *H. pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem*. **2003**, 278, 32552–32560, doi:10.1074/jbc.M305536200.
53. Wang, J.X.; Kaiedaa, S.; Ameria, S.; Fishgala, N.; Dwyera, D.; Dellingerc, A.; Kepley C.L.; Gurish M.F.;Nigrovic P.A. IL-33/ST2 axis promotes mast cell survival via BCLXL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2014**, 11, 10281–10286, doi:10.1073/pnas.1404182111.
54. Gonciarz, W.; Walencka, M.; Moran, A.P.; Hinc, K.; Obuchowski, M.; Chmiela, M. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. *J. Biomed. Sci*. **2019**, 26, 23, doi:10.1186/s12929-019-0515-z.
55. Gonciarz, W.; Krupa, A.; Hinc, K.; Obuchowski, M.; Moran, A.P.; Gajewski, A.; Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. *PLoS ONE.* **2019**, 14, e0220636, doi.org/10.1371/journal.pone.0220636.
56. De Paulis, A.; Prevete, N.; Rossi, F.W.; Rivellese, F.; Salerno, F.; Delfino, G.; Liccardo B.; Avilla E.; Montuori N.; Mascolo M.; et al. *Helicobacter pylori Hp*(2-20) promotes migration and proliferation of gastric epithelial cells by interacting with formyl peptide receptors in vitro and accelerates gastric mucosal healing in vivo. *J. Immunol.* **2009**, 183, 3761–3769, doi:10.4049/jimmunol.0900863.
57. Lott, J.M.; Sumpter, T.L.; Turnquist, H.R. New dog and newtricks: Evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J. Leukoc. Biol*. **2015**, 97, 1037–1048, doi:10.1189/jlb.3RI1214-595R.
58. Hu, W.T.; Li, M.Q.; Liu, W.; Jin, L.P.; Li, D.J.; Zhu, X.Y. IL-33 enhances proliferation and invasiveness of decidual stromal cells by up-regulation of CCL2/CCR2 via NF-kB and ERK 1/2 signalling. *Mol. Hum. Reprod*. **2014**, 20, 358–372, doi:10.1093/molehr/gat094.
59. Seki, K.; Sanada, S.; Kudinova, A.Y.; Steinhauser, M.L.; Handa, V.; Gannon, J.; Lee R.T. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ. Heart Fail*. **2009**, 2, 684–691, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.873240.
60. Oboki, K.; Ohno, T.; Kajiwara, N.; Saito, H.; Nakae, S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol. Int*. **2010**, 59, 143–160, doi:10.2332/allergolint.10-RAI-0186.
61. Oboki, K.; Ohno, T.; Kajiwara, N.; Arae, K.; Morita, H.; Ishii, A.; Nambu A, Abe T.; Kiyonari H.; Matsumoto K.; et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, 107, 18581–18586, doi:10.1073/pnas.1003059107.
62. Matter, K.; Aijaz, S.; Tsapara, A.; Balda, M.S. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol*. **2005**, 17, 453–458.
63. Varbanova, M.; Frauenschläger, K.; Malfertheiner, P. Chronic gastritis—An update. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. **2014**, 28, 1031–1042, doi:10.1016/j.bpg.2014.10.005.
64. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol*. **1994**, 12, 991–1045, doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015.
65. Carriere, V.; Roussel, L.; Ortega, N.; Lacorre, D.A.; Americh, L.; Aguilar, L.; Bouche G.; Girard J.P.IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, 104, 282–287, doi:10.1073/pnas.0606854104.
66. Ramaro, N.; Meyer, T.F. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: Quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect. Immun.* **2001**, 69, 2604–2611, doi:10.1128/IAI.69.4,26.04-2611.2001.
67. Mnich, E.; Kowalewicz-Kulbat, M.; Sicińska, P.; Hinc, K.; Obuchowski, M.; Gajewski, A.; Moran A.P.; Chmiela M. Impact of *Helicobacter pylori* on the healing process of the gastric barrier. *World J. Gastroenterol*. **2016**, 22, 7536–7558, doi:10.3748/wjg.v22.i33.7536.

68. Viladomiu, M.; Bassaganya-Riera, J.; Tubau-Juni, N.; Kronsteiner, B.; Leber, A.; Philipson, C.W.; Zoccoli-Rodriguez V.; Hontecillas R. Cooperation of gastric mononuclear phagocytes with *Helicobacter pylori* during colonization. *J. Immunol.* **2017**, 198, 3195–3204, doi:10.4049/jimmunol.1601902.
69. Krzysiek-Maczka, G.; Targosz, A.; Ptak-Belowska, A.; Korbut, E.; Szczyrk, U.; Strzalka, M.; Brzozowski T. Molecular alterations in fibroblasts exposed to *Helicobacter pylori:* A missing link in bacterial inflammation progressing into gastric carcinogenesis? *J. Physiol. Pharmacol*. **2013**, 64, 77–87.
70. Yi, L.; Huang, X.; Guo, F.; Zhou, Z.; Chang, M.; Tang, J.; Huan J. Lipopolysaccharide induces human pulmonary micro-vascular endothelial apoptosis via the YAP signaling pathway. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **2016**, 6, 133, doi:10.3389/fcimb.2016.00133
71. Gajewski, A.; Gonciarz, W.; Hinc, K.; Obuchowski, M.; Chmiela, M. Dysfunction of gastric barrier in the milieu of 7-ketocholesterol, acetylsalicylic acid and *Helicobacter pylori* compounds. Potential implications in the development of coronary heart disease. *Helicobacter.* **2018**, 23 (Suppl. S1), 65, doi:10.1111/hel.12525.
72. Shibata, J.; Goto, H.; Arisawa, T.; Niwa, Y.; Hayakawa, T.; Nakayama, A.; Mori, N. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) induced apoptosis by soluble TNF receptors in *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* **1999**, 45, 24–31, doi:10.1136/gut.45.1.24.
73. Walencka, M.; Gonciarz, W.; Mnich, E.; Gajewski, A.; Stawerski P.; Knapik-Dabrowicz A.; Chmiela M. The microbiological, histological, immunological and molecular determinants of *Helicobacer pylori* infection in guinea pigs as a convenient animal model to study pathogenicity of these bacteria and the infection dependent immune response of the host. *Acta Biochim. Pol*. **2015**, 62, 697–706, doi:10.18388/abp.2015_1110.
74. Rechciński, T.; Chmiela, M.; Małecka-Panas, E.; Płaneta-Małecka, I.; Rudnicka, W. Serological indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. *Microbiol. Immunol*. **1997**, 41, 387–393.
75. Czkwianianc, E.; Chmiela, M.; Lawnik, M.; Płaneta-Małecka, I.; Rudnicka, W. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in children with gastroduodenitis. *Centr. Eur. J. Immunol.* **1997**, 22, 240–247.
76. Jensen, E.C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using image. *Anat. Rec*. **2013**, 3, 378–381.doi:10.1002/ar.22641.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

World Journal of Gastroenterology

Submit a Manuscript: http://www.f6publishing.com

World J Gastroenterol 2017 June 14; 23(22): 3964-3977

DOI: 10.3748/wjg.v23.i22.3964

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

REVIEW

Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections

Magdalena Chmiela, Weronika Gonciarz

Magdalena Chmiela, Weronika Gonciarz, Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-237 Lodz, Poland

Author contributions: Chmiela M designed and wrote the manuscript; Gonciarz W wrote some parts of the manuscript and designed the figure.

Supported by the National Science Center grants, No. UMO-2013/09/N/NZ6/00805 and No. UMO-2015/17/N/NZ6/03490.

Conflict-of-interest statement: No potential conflict of interest.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: Magdalena Chmiela, MD, PhD, Professor, Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland. chmiela@biol.uni.lodz.pl
Telephone: +48-42-6354186
Fax: +48-42-6655818

Received: January 18, 2017
Peer-review started: January 21, 2017
First decision: February 9, 2017
Revised: May 16, 2017
Accepted: June 1, 2017
Article in press: June 1, 2017
Published online: June 14, 2017

Abstract

Gram-negative bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonize gastric mucosa in humans and increase the risk of serious diseases such as gastric and duodenal ulcers, stomach cancers and mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. The role of *H. pylori* infection in the pathogenesis of several extragastric diseases has been suggested including immune thrombocytopenic purpura, iron deficiency anemia, vitamin D deficiency, cardiovascular diseases, diabetes mellitus and dermatological disorders. Also neurological diseases and even lung cancer have attracted researchers concern. The relation between *H. pylori* infection and a growth retardation in children has also been suggested. Many mechanisms of molecular mimicry between *H. pylori* and the host have been proposed as a pathogen strategy to manipulate the immune system of the host in order to remain unrecognized and avoid eradication. A lot of effort has been put into the demonstration of homologous sequences between *H. pylori* and host compounds. However, knowledge about how often autoantibodies or autoreactive T lymphocytes induced during *H. pylori* infections cause pathological disorders is insufficient. This review provides data on *H. pylori* antigenic mimicry and possible deleterious effects due to the induction of immune response to the components common to these bacteria and the host.

Key words: *Helicobacter pylori*; Molecular mimicry; Anti-self response; Extragastric effects

© **The Author(s) 2017.** Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and the host structures has been suggested as an effective mechanism of antibody production, potentially autoreactive. The chronic character of *H. pylori* infections increases the risk of such production and initiation or maintenance of *H.*

pylori related pathological disorders triggered by the host effector immune mechanisms during infection. The panel of components common to *H. pylori* and the host is still increasing and thus the risk of autoimmune complications is an open problem.

Chmiela M, Gonciarz W. Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections. *World J Gastroenterol* 2017; 23(22): 3964-3977 Available from: URL: http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i22/3964.htm DOI: http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i22.3964

INTRODUCTION

H. pylori pathogenicity - brief summary

Helicobacter pylori (*H. pylori*) a Gram-negative pathogenic bacterium, which has been described by Warren and Marshall in 1983[1], colonizes the gastric epithelium of humans (on average, 50% of the human population) and induces an excessive inflammatory response with or without symptoms (20% of cases). *H. pylori* infections possibly lead to different disorders such as: gastric and duodenal ulcers and, chronic gastritis, and even malignant diseases, including: mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma and gastric cancer[2-6]. Polymorphisms of the host genes encoding interleukins (ILs), including IL-1β, tumor necrosis factor (TNF-α) and cyclooxygenase -2 (COX2) have been suggested to increase the risk of infection and its severe consequences[7]. *H. pylori* strains have different genes encoding virulence factors that are important for disease development[8-10], which are either secreted, membrane-associated or translocated into cytosol of the host cells *via* the IV type secretion system, where they can affect the host cell functions[4]. *H. pylori* strains produce different adhesins, such as blood group antigen - binding adhesin (BabA), sialylated blood group - related adhesin (SabA), adherence - associated lipoprotein (AlpA/B) and outer membrane inflammatory protein (OipA), which promote close contact between the bacteria and the gastric epithelium[8-10]. Soluble factors such as urease and vacuolating cytotoxin (VacA) alter gastric cell survival and intercellular adhesion[11-16].

H. pylori CagA (Cytotoxin - associated gene A) is a highly immunogenic protein, which can trigger inflammatory responses in host gastric tissues, and it may influence the cell morphology, polarity, and proliferation; CagA also modulates the activity of immune cells and increases the risk of severe consequences, such as gastric ulcer and cancer[17-25]. Due to bacterial cell lysis, CagA and other *H. pylori* virulence factors can also be delivered to the gastric mucosa in a soluble form and affect the host immune cells infiltrating this milieu[24-27]. Moreover, *H. pylori* continuously produces phospholipid vesicles, which can be distributed by the circulation and function as a secondary extragastric source of CagA and other virulence factors[28-34]. Mucosal recognition of CagA is associated with the stimulation of epithelial cells that produce elevated levels of various cytokines, including IL-1β, IL-6 and IL-8, which is followed by the enhanced infiltration of activated neutrophils and severe mucosal inflammation that increases the risk of gastric cancer[19,35-38].

In addition, flagellin and especially lipopolysaccharide (LPS) were investigated to address their role in *H. pylori* pathogenesis *via* activation of NF-κB and chemokine expression[39]. Previous studies showed that *H. pylori* LPS possesses immunomodulatory properties that diminish the effectiveness of the phagocytosis, cytotoxic activity and the expansion of NK cells and T lymphocytes[40-42].

The interactions of *H. pylori* with host cells result in adherence, induction of inflammatory responses through cytokine/chemokine release, apoptosis or proliferation, which finally result in persistent colonization, severe inflammation, and disruption of the epithelial barrier function[43,44].

This process can enable the translocation of *H. pylori* virulence factors and inflammatory mediators into the circulation and promote or intensify the development of systemic inflammatory response and the possible clinical effects of *H. pylori* infections outside the stomach[45,46].

The role of *H. pylori* in some hematologic conditions has been considered, such as immune thrombocytopenic purpura (ITP), iron deficiency anemia (IDA), and vitamin B12 deficiency. The possible role of *H. pylori* infection in other hematologic diseases, such as non-Hodgkin lymphomas of the stomach, monoclonal gammopathy of undetermined significance, megaloblastic anemia and myelodysplastic syndromes, has been suggested[47]. The elevated risk of childhood leukemia and hemorrhage in patients with coagulation disorders due to *H. pylori* infection has also been considered. The effects of *H. pylori* on other disorders, such as cardiovascular diseases, diabetes mellitus, dermatological disorders, neurological disorders and even lung cancer, have also attracted attention of researchers[48-53]. Data obtained from these studies showed that the immune response induced by *H. pylori* may influence the clinical outcome of these disorders. Many seroepidemiological studies have shown that patients with coronary heart disease (CHD) produce anti-*H. pylori* antibodies[54-57]. A strong immune response triggered by *H. pylori* CagA - positive strains has been suggested to influence the development of atherosclerosis[58]. Many previous studies have stated that chronic infection with *H. pylori* has a significant influence on the immune system. Therefore, the possible mechanisms of *H. pylori* infections in the pathogenesis of the majority of extragastric diseases include chronic local or systemic inflammation and the

initiation of autoimmune responses[59].

CONCEPT OF TRIGGERING AUTOIMMUNE DISORDERS DUE TO MOLECULAR MIMICRY BETWEEN INFECTIOUS AGENTS AND HOST COMPONENTS

Molecular mimicry is a common strategy used by infectious agents to adapt to the host organism and avoid its immune response mechanisms. Molecular mimicry is defined as an antigenic and functional similarity between the second-row microbial structures and host molecules that leads to the production of auto-reactive antibodies, which may contribute to the development of autoimmune disorders. Similarities within and between linear amino acid sequences and spatial structures have been identifiedd[60-62].

Streptococcus pyogenes is one of the most intensely studied bacterial pathogens, that can trigger autoimmune diseases in genetically susceptible individuals. *S. pyogenes* is involved in the development of rheumatic fever and glomerulonephritis due to the induction of antibodies recognizing bacterial M protein and N-acetyl-β-D-glucosamine (GLcNAc) as well as human heart myosin[62,63]. Moreover, infections with Gram-negative bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae* and *Campylobacter jejuni*, also stimulate the production of crossreactive antibodies that recognize the human leukocyte antigen (HLA)-B27 or gangliosides[62,64]. Additionally, certain viruses, such as the Epstein-Barr virus and the hepatitis B virus, share similar sequences with proteins in the central nervous system[65,66]. Molecular mimicry combined with the ability of T cells to evade the mechanisms of tolerance has been suggested as a potential mechanism implicated in the pathogenesis of various autoimmune diseases, including multiple sclerosis, diabetes mellitus and spondyloarthropaties[60,66-68].

MOLECULAR MIMICRY BETWEEN *H. PYLORI* AND HOST CELL COMPONENTS

The mechanisms by which *H. pylori* infections lead to various gastric and potentially extragastric disorders are still poorly understood. One concept indicates the role of autoimmune processes. Chronic exposure to *H. pylori* compounds may initiate autoimmune gastritis due to molecular mimicry between *H. pylori* structures and the host tissue. The hypothesis of the induction by *H. pylori* anti-self reactions was proposed after antibodies with reactivity to the gastric antral mucosa were detected in the sera of infected patients[69-71]. Many mechanisms underlying the molecular mimicry between *H. pylori* and the host have been proposed and many efforts have been made to identify homologous sequences between *H. pylori* and host polypeptides, including the P-type adenosine triphosphate (ATP)-ases CopA and CopP that are involved in heavy metal iron transport, 686-bp amino acid ATPase, VacA, and urease beta chain *vs* gastric H+K+-ATPase[72-75], heat shock protein (Hsp) A *vs* GroEs, HspB *vs* 60-kDa host Hsp[76], and hemagglutinin/protease (hap) *vs* carbonic anhydrase[77]. However, whether and how often the autoantibodies induced in response to *H. pylori* infection are involved in various post-infectious pathologies due to the pathogen - induced autoreactive T lymphocytes or antibodies is unclear. The examples of potential autoantigenic host targets for anti-*H. pylori* antibodies are listed in Figure 1.

H+/K+-adenosine triphosphatase as an autoantigen in autoimmune gastritis

Autoimmune gastritis/pernicious anemia is characterized by two phenomena: atrophy in the corpus and fundus of the stomach and autoantibody production against parietal cells (PC) and their secretory component called an intrinsic factor (IF)[78-80]. Anti-PC antibodies, which target H+/K+ ATPase, a gastric proton pump, have been detected in 60%-85% of patients with autoimmune gastritis, whereas antibodies to IF have been detected in 30%-50% of patients with autoimmune gastritis[81-83]. Chronic autoaggression to H+/K+ ATPase may diminish gastric acid secretion, and cause hypergastrinemia and anemia due to iron deficiency[84,85]. Pernicious anemia is also characterized by a vitamin B12 deficiency. Patients suffering from autoimmune gastritis are predisposed to gastric tumors and adenocarcinomas[86]. In patients with type 1 diabetes or autoimmune thyroid disease, the prevalence of autoimmune gastritis is approximately three-fold higher than that of the general population, in which such autoimmune disorder has the frequency of 2%[87]. CD4+ T lymphocytes, which recognize parietal cell H+/K+ ATPase, have been shown to be involved in the development of autoimmune gastritis. H+/K+ ATPase is released from parietal cells during normal cell turnover and is selectively captured and then processed by antigen - presenting cells[88,89]. Another possibility is that *H. pylori* infection may initiate the development of autoimmune gastritis and pernicious anemia through the activation of T lymphocytes that are autoreactive to H+/K+ ATPase due to the antigenic mimicry between gastric H+/K+ ATPase and *H. pylori* at the T cell level[90]. Antibodies to gastric H+/K+ ATPase and their secretory forms are produced by B lymphocytes in cooperation with CD4+ antigen-specific T lymphocytes[91,92]. The deleterious effects of autoantibodies can be a consequence of T cell perforin-dependent cytotoxicity and apoptosis initiated by interaction between the Fas receptor (Fas) an Fas ligand[71]. The role of chronic *H. pylori* infections in the development of atrophic gastritis has

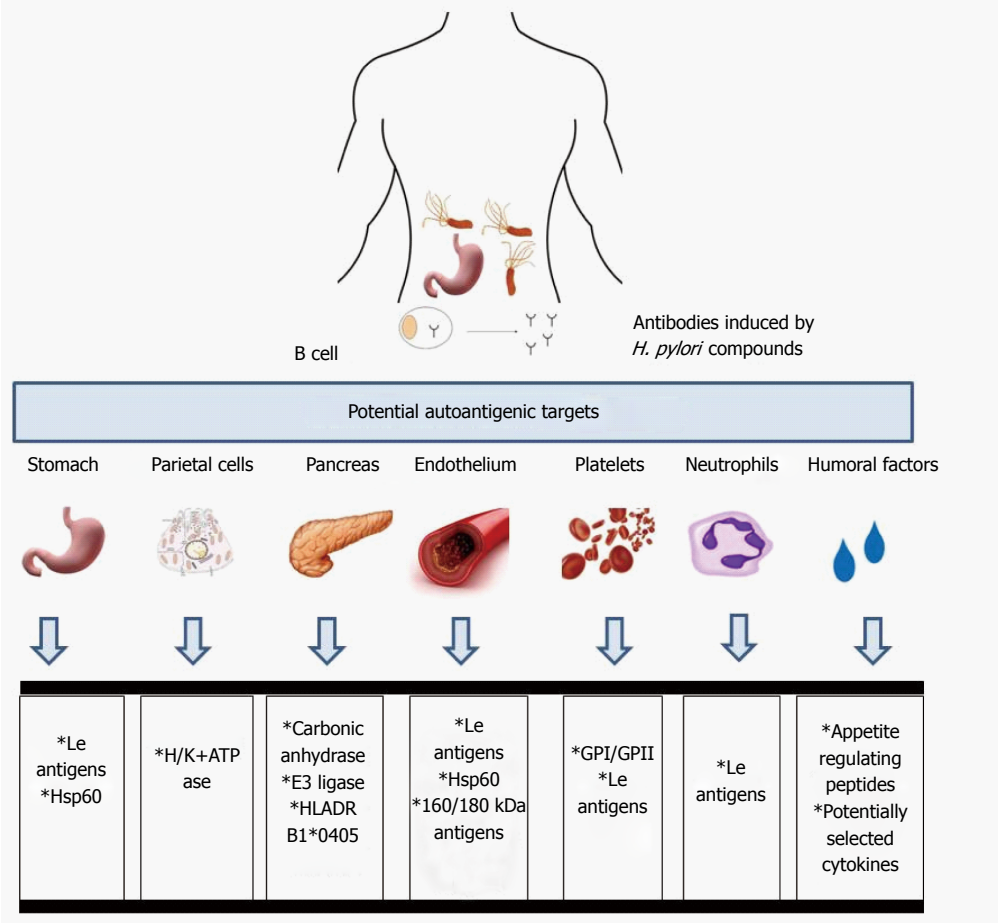


Figure 1 Hypothesis of autoimmune disorders due to molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host components. Chronic exposure of the host immune system to *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) components that have homologous sequences with the host cellular or soluble compounds may initiate the production of autoantibodies. However, how often the autoantibodies arising during *H. pylori* infection are involved in various post-infectious pathologies should be elucidated. The graph shows the examples of host targets for the antibodies induced by *H. pylori* components. GP: Glycoproteins; Hsp: Heat shock protein; H+/K+ ATPase: H+/K+-adenosine triphosphatase; HLA: Human leukocyte antigens; CCRL1: CC chemokine receptor-like 1; Le: Lewis antigens.

been suggested on the basis of the positive correlation between gastric autoantibodies and antibodies specific to *H. pylori* antigens in the majority of patients with pernicious anemia[69,75,93-95]. However, this association has not been confirmed in other studies[96,97].

Anti-Lewis antibodies induced by H. pylori lipopolysaccharide determinants

The presence of antibodies that react with the gastric mucosa in patients infected with *H. pylori* suggested that the autoantibodies induced by this pathogen may play an important role in the *H. pylori* - associated inflammatory response and cause deleterious gastric effects[75,94,98,99]. These antibodies could be stimulated by various Lewis (Le) antigens (Le^x, Le^y and $Le^{x/y}$) that are present in the LPS structure of many *H. pylori* isolates[99,100], and on human cells including polymorphonuclear leucocytes, gastric epithelial cells and endothelial cells. The LPS O-specific chain of the *H. pylori* reference strain NCTC (National Collection of Type Cultures) 11637 was found to possess determinants similar to the human Le^x blood group antigens**,** whereas LPS of the *H. pylori* MO19 strain contains determinants similar to human Le^y[101-103]. Other blood group antigens, including H type 1, Le^a, Le^b, nonfucosylated polylactosoamine (i-antigen), sialyl Le^x, and blood group A but not H type 2 have been detected in various *H. pylori* isolates. Additionally, strains bearing two or three blood group antigens in their LPS have been described[103-106]. The *H. pylori* LPS phase variation, which is defined as the random reversible change in phenotype in a range of blood group determinants, has been described for both reference and clinical strains[107,108]. During *H. pylori* infection different environmental and host factors including - gastric juice acidity may promote the selection of bacteria with the best phenotype in terms of virulence[109,110]. In a rhesus monkey model of *H. pylori* infection, the host Le^y phenotype of the gastric mucosa was shown to select the Le^y - positive phenotype of *H. pylori*, and the Le^x host gastric phenotype was shown to select the Le^x - positive bacteria[109]. Phase variations from Le^x to i-Ag and back to Le^x, from Le^x to Le^x plus Le^y, and from Le^x to Le^y and forming Le^a have been described[104,111-113]. The molecular mechanism of *H. pylori* LPS phase variation

depends on mutations in the genes encoding α3-fucosylotransferases, the activity of these proteins and their preference for carbohydrate residues that determine antigenic specificity[82,108,114-117].

Experiments performed with the use of anti-Le monoclonal antibodies induced by immunization of mice with *H. pylori* showed that these antibodies reacted with both murine and human gastric mucosa, foveolar and glandular epithelial cells and parietal cell canaliculi. The anti-Le^x monoclonal antibodies provoked by *H. pylori* were shown to react with polymorphonuclear leukocytes, gastric mucin and H+/K+ ATPase, which all express Le antigens[118]. However, it is unclear how anti-Le antibodies influence *H. pylori* adhesion and colonization of gastric mucosa in light of the results showing that the attachment of *H. pylori* to the human gastric epithelium is mediated by blood group antigens, including Le^b, Le^x and sialylated-Le^x[8,119-121]. One possible mechanism underlying this effect is the diversification of *H. pylori* in the human host through lipopolysaccharide phase variation due to the heterologous expression of the alpha 1,3-fucosyltransferase gene[107,117]. The role of anti-$Le^{x/y}$ antibodies in the pathogenesis of *H. pylori* - driven deleterious effects is controversial. It has been hypothesized that anti-Le antibodies initiated by *H. pylori*, if bound to the gastric epithelium, can cause complement - dependent cell lysis promoting an excessive inflammatory response[99]. In early studies, these antibodies were not detected at all or only found in a low number of serum samples from individuals infected with a *H. pylori*. Other studies, including our previous work, have revealed that humans may produce anti-Le^x antibodies, particularly those of the IgM class, in the absence of *H. pylori* infection or in the context of *H. pylori* - independent dyspepsia[118,122]. This finding indicates that anti-Le antibodies may be natural antibodies associated with the physiological autoimmunity required for the elimination of self-antigens. However, the incidence of this antibody production increases with age and, can be associated with the history of infections during the life of an individual[123]. The occurrence of anti-Le^x antibodies in the sera of subjects not infected *H. pylori* could be induced by other microorganisms, such as streptococci, *Eikenella corrodens* or *Acinetobacter actinomycetemcomitans* bearing Le^x determinants[124]. However, the possibility that *H. pylori* locally induces anti-$Le^{x/y}$ antibodies, which bind directly to gastric mucosal epitopes, and are absent in the serum, cannot be excluded[88,99]. Interestingly, the frequency of anti-$Le^{x/y}$ antibodies in the sera of patients infected with *H. pylori* and exhibiting gastritis symptoms, as well as in the patients with confirmed ischemic heart disease and *H. pylori* co-infection, was correlated with the increased occurrence of soluble $Le^{x/y}$-anti-$Le^{x/y}$ IgG immune complexes[123-125]. It is possible that the deleterious effects of anti-Le antibodies depend on their ability to bind ligands and form rather small immune complexes, which may be deposited locally in both gastric and endothelial tissues where they can promote the inflammatory response. Perhaps the severity of anti-Le antibody production in *H. pylori* - infected individuals is associated with higher exposure to Le antigens due to inflammation, damage to the gastric epithelium and/or vascular endothelial cells, and the migration and activation of immune cells. Since the expression of $Le^{x/y}$ determinants in *H. pylori* is related to the *cagA* status[126], anti-Le antibodies may increase the inflammatory effects on the gastric mucosa in association with *H. pylori* virulence proteins, such as CagA, VacA and urease. However, Zheng *et al*[127] showed that peptic ulcer disease was not related to *cagA* status, *iceA* (induced by contact with the epithelium) or *vacA* genotypes, but there was an association with increased expression of a combination of Le antigens in *H. pylori*. This finding suggests that gastric disorders related to *H. pylori* infection depend on a specific type of host-pathogen interactions. The bacterial Le determinants may promote the adaptation of bacteria to the host gastric mucosa, which allow them to evade the host immune response and establish a chronic infection, and tissue destruction *via* the induction of anti-Le autoantibodies. The complex strategy of *H. pylori* for survival in the gastric mucosa of the host involves both structural modifications of lipid A in LPS to diminish its endotoxic properties and the expression and variation of Le determinants that mimick host components[125].

Link between H.pylori infection and ITP

In 1988 Gasbarrini *et al*[128], showed that eradication of *H. pylori* resulted in regression of ITP. There are several potential mechanisms that combain *H. pylori* infection with ITP. One is molecular mimicry between *H. pylori* CagA protein and platelet glycoproteins: GPI and GPII[129-131]. In ITP patients infected with CagA positive but not CagA negative *H. pylori* strains a higher number of B lymphocytes producing anti-CagA antibodies that crossreact with the platelet specific peptides have been detected, which was correlated with the elevated levels of such antibodies in the patients sera[129,131]. A complement dependent mechanism of platelet destruction has been suggested[132,133]. Also Lewis antigenic determinants deposited on the surface of platelets may be recognized in ITP patients by anti-Le antibodies. During *H. pylori* infection the production of anti-Le antibodies is enhanced in response to Le antigens present in *H. pylori* LPS[123,130]. The infection can promote platelet aggregation, and the enhancement of expression of phosphatidilserine and p-selectin that may be involved in ITP development[133]. The platelet aggregation is also due to binding the von Willebrand factor by *H. pylori*[134]. Another possibility is that anti-*H. pylori* antibodies that link the platelet GP I protein with

phagocyte FcRIIa receptors may increase the clearance of platelets during phagocytosis. Bacterial LPS if deposited on the surface of platelets may enhance the immune phagocytosis[135]. Th1 lymphocytes activated during infection by *H. pylori* antigens are important for the maintenance of ITP[133]. Concerning the host genetic factors the HLA-DQB1*03 haplotype has been proposed as useful marker for prediction of the platelet response in *H. pylori* infected patients[136].

H. pylotri - related autoimmune hypothesis of cardiovascular disorders

H. pylori infections, especially those with CagA - positive strains, have been suggested to be associated with atherosclerotic vascular disease[58,137]. Patients suffering from CHD were found to be chronically exposed to *H. pylori* at a higher frequency than non-CHD individuals, which was shown by the high frequency and elevated levels of specific anti-*H. pylori* IgG and IgA antibodies[54,138,139] and strong inflammatory response[140], upregulation of biochemical markers, coronary lumen reduction, and elevated levels of low density lipoprotein, C-reactive protein, homocysteine, fibrinogen, plasminogen and inflammatory cytokines and the higher incidence of diabetes in *H. pylori* - infected individuals than in uninfected individuals[141-146]. However, in several studies, no associations between *H. pylori* seropositivity, exposure to CagA and CHD incidence have been found[46,147]. In the search for links between *H. pylori* infection and CHD, it has been suggested that *H. pylori* - induced antibodies with cross-reacting potency towards the host endothelium may play a role in the development and maintenance of atherosclerotic lesions. Autoimmune responses have been shown to participate in the initiation and progression of atherosclerosis[148]. Franceschi *et al*[149], have investigated whether antibodies against CagA cross-reacted with antigens of normal and atherosclerotic arteries, which would provide a possible link to the disorders observed during atherosclerosis. In this study, anti-CagA antibodies interacted with different parts of smooth muscle cells and endothelial cells present in the thin layer sections of atherosclerotic vessels. The antibodies recognized two vascular antigens of 160 and 180 K, which were present in both normal and atherosclerotic artery lysates and a 130 K protein from *H. pylori* lysates[149].

All *H. pylori* isolates produce urease, which can hydrolyze the urea present in the human stomach[150,151]. *H. pylori* urease is composed of a 26.5 kDa UreA subunit (β chain) and a 61.7 UreB subunit (α chain), which are encoded by the *ureA* and *ureB* genes, respectively[152,153]. Although the UreA subunit is the major immunodominant protein the UreB subunit has a higher number of epitopes recognized by anti-urease antibodies[154,155]. The occurrence of anti-urease antibodies was correlated with age and the immunoglobulin class and was linked with the severity of *H. pylori* - related disease symptoms. Superficial gastritis was correlated with a higher production of anti-urease IgA, whereas athrophy of the gastric epithelium was associated with elevated levels of anti-urease IgG immunoglobulins[156]. Recently, a hypothesis linking atherosclerosis and *H. pylori* - induced anti-urease antibodies has been suggested[157]. In the study by Arabski *et al*[158], a significant correlation between the level of antibodies recognizing the 8-mer synthetic peptide corresponding to the UreB minimal flap epitope of *H. pylori* urease and atherosclerosis symptoms was found. This *H. pylori* urease region exhibited similarity to the human CCRL1 (CC chemokine receptor-like 1) protein, which is expressed in heart tissue. Antibodies to *H. pylori* urease initiated during infection might be autoreactive due to the binding of the IKEDV motif in the CCRL1 host receptor. This antigen-antibody interaction may potentially accelerate complement - dependent tissue destruction and the inflammatory response in patients with atherosclerosis lesions and *H. pylori* infections[157,158].

H. pylori synthesizes the two heat shock proteins: HspA (GroES chaperonin or Hsp 10 homologue) and HspB (GroEL chaperonin or Hsp60 homologue)[76,159,160]. Both antigens reportedly induce autoimmune responses[161,162]. The study by Matusiak *et al*[139], supports the idea that chronic exposure to *H. pylori* in patients with CHD may result in an increase in the level of serum lipopolysaccharide - binding protein (LBP) and the production of antibodies against *H. pylori* Hsp B, which crossreact with human Hsp60. Both LBP and anti-Hsp 60 antibodies may facilitate the inflammation in the vascular endothelium. The pathological role of LBP may depend on the phenotype of the vascular endothelium, which exhibits proinflammatory features such as increased expression of pathogen recognition receptors. The involvement of anti-Hsp60 Igs in CHD-related deleterious processes can be explained by the antigenic mimicry and complement - dependent cell damage, which are possibly induced by these antibodies, similarly to the anti-*H. pylori* urease antibodies. Because the expression levels of Hsp proteins, including Hsp60, increases as a result of the inflammatory process in atherosclerotic lesions, it can be assumed that these proteins may be a target for anti-Hsp antibodies initiated by an infectious agent[148]. In regard to HspA, the clinical outcomes of *H. pylori* infection have been shown to be unrelated to HspA antigenicity or amino acid sequence variation[160]. However, age-specific responses to HspA in *H. pylori*-positive subjects have been found[163].

H. pylori infection and autoimmune pancreatitis

The association between *H. pylori* infection and insulin resistance has been suggested[146]. Recently, a significant homology between the human carbonic anhydrase II segment 5-255 and the α-carbonic

anhydrase of *H. pylori* segment 23-239, has been found, with 27% identity and 41% similarity[77]. Anhydrase is a key enzyme for the survival and growth of *H. pylori* in the gastric mucosa. In humans carbonic anhydrase II coordinates the physiological function of the pancreas. Moreover, the homologous regions contain the binding motifs of the HLA DRB1*0405[77]. These observations support the idea that *H. pylori* infection can trigger autoimmune pancreatitis in genetically susceptible individuals. In 2009, Frulloni *et al*[164] showed that in almost all patients with autoimmune pancreatitis there are antibodies against *H. pylori* plasminogen-binding protein (PBP). This PBP protein shows homology with ubiquitin-protein ligase E3 component n-recognition 2, which is an enzyme highly expressed in the acinar cells of the pancreas. This could be another example of *H. pylori* and host molecular mimicry triggering autoimmune pancreatitis.

H. pylori - host antigenic mimicry and growth retardation in children

The relationship between *H. pylori* infections and growth retardation in children is poorly understood. Growth retardation may result from appetite disorders, abnormal metabolism and iron deficiency[165]. Infection with *H. pylori* causes gastrointestinal bleeding, abnormal absorption of iron due to the impaired gastric acid and insulin secretion, and vitamin C uptake. The mechanism driving anemia in children infected with *H. pylori* may be antigenic mimicry. *H. pylori* has an iron-binding protein similar to ferritin, which prevents iron excess. The infection also causes an increase in the concentration of iron-binding lactoferrin in the stomach epithelium[165]. Recent studies indicate the role of the immune system in controlling behaviors related to food intake by producing autoantibodies against peptides and neuropeptides regulating appetite, which may result in a reduction in height and weight[166].

The gastrointestinal microflora, including *H. pylori* may be a source of antigens, which are similar to appetite - regulating peptides. Thus, the bacterial antigens are potentially able to stimulate the immune system of the gastrointestinal tract to produce autoantibodies that are cross-reactive with many of the appetite -regulating peptides and that modify the actions of these peptides. In the sera of pediatric patients with short stature the autoantibodies against 14 key hormones and peptides regulating appetite such as leptin, ghrelin, orexin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH), have been detected[166]. These antibodies are also present in healthy subjects, which suggests physiological role for these antibodies in the regulation of hunger and satiety. A number of common sequences between these peptides and proteins of microorganisms have been identified, including antigenic similarity between leptin and the intestinal microflora proteins of *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus bacteriophage* and representatives of *Candida* and *Aspergillus*. The sequence homology of α-MSH and the components of pathogenic *E. coli*, *H. pylori*, *Clostridium tetani*, and *Candida albicans* has also been demonstrated. Regulatory peptides are signaling molecules, and autoantibody blocking of their sequences may alter their biological activity. A recent study highlighted the impact of *H. pylori* on the secretion of ghrelin and leptin[167]. Patients infected with *H. pylori* have been shown to have a significantly lower level of leptin and ghrelin in the plasma. The ghrelin concentration was also lower in the mucous cells of the stomach. After eradication of the infection, the level of ghrelin rose again. However, other authors did not confirm this result[168]. In the studies carried out on a group of Polish children, it was shown that the levels of gastrin in the patients infected with *H. pylori* were significantly higher, whereas the levels of ghrelin and leptin were lower than those of the controls[169]. Growth failure in children due to anemia occurs more often in patients infected with *H. pylori cagA*+ than *cagA*- strains. It has been shown that platelet glycoprotein and the CagA protein are similar and that many patients infected with *H. pylori* with signs of thrombocytopenia have possess anti-platelet antibodies[165]. These results suggest a role for the CagA protein in the development of systemic pathological processes in children infected with *cagA*+ *H. pylori* strains. Further studies are needed to assess the prevalence and the levels of antibodies against the common sequences for CagA protein and peptides regulating appetite in children with short stature. These sequences have been identified by bioinformatic analysis of leptin, ghrelin, visfatin and resistin, which regulate appetite, energy homeostasis, and potentially the immune system[167,170-173]. The release of these proteins is often stimulated by inflammatory processes, growth and gonadal hormones. The results of experiments conducted with serum samples from children with idiopathic short stature and growth hormone deficiency showed that some of the children that were also infected with *H. pylori* and/or exposed to *C. albicans* have antibodies against ghrelin, leptin, orexin A and α-MSH, which may potentially disturb the physiological functions of these molecules[174,175]. This result is potentially due to molecular mimicry between antigens of these microbiota and the mentioned peptides. However, further studies are needed to elucidate this suggested relation.

Newly described gastric potentially autoantigenic proteins as possible targets for antibodies induced by *H. pylori*

Recently, amino acid identity between additional autoantigens derived from the gastric mucosa and gastric adenocarcinoma cells (AGS) and several *H. pylori* proteins has been identified. A proteomics

investigation of anti-gastric autoantibody profiles in the sera of 300 Korean adults infected with *H. pylori*, revealed nearly forty autoantigenic proteins, including nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+) alcohol dehydrogenase, alpha enolase, gastrokine-1, gastric triacylglycerol lipase, Hsp70 kDa protein 1, and peroxiredoxin-2. These proteins were detected in the gastric mucosal tissue[59]. The programmed cell death 6 - interacting protein, serum albumin and T-complex protein 1 subunit gamma were identified in the AGS cells. Several proteins such as albumin, alpha-enolase, annexin A3, cytoplasmic actin 1, Hsp - like 71 kDa protein and leukocyte elastase inhibitor, were detected in AGS cells and gastric mucosal tissue. Furthermore, the alpha-enolase, glutathione S-transferase P, Hsp - like 71 kDa protein, Hsp70 kDa protein 1, mitochondrial Hsp60 kDa, peroxiredoxin-2, 78 kDa glucose-regulated protein precursor, tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 and tryptophan-aspartic acid repeat-containing protein (WD), showed 60% or even higher amino acid positivity[59]. These newly described gastric proteins may have the ability to control and prevention gastroduodenal disorders linked to *H. pylori* infections, such as chronic gastritis, gastroduodenal ulcers, atrophic gastritis and gastric cancers. However, their role in the pathophysiology of these disorders needs to be examined.

Gastric tissue ulceration initiated by *H. pylori* is related to the elevated production of alarming molecules, including IL-33, which may function as a classic cytokine or transcription factor[176]. IL-33 is suspected to alert the immune system to restore epithelial cell homeostasis. However, IL-33 has also been suspected to play an emerging role in autoimmune diseases[177]. Bioinformatic analysis indicates homology between the amino acid sequences of *H. pylori* CagA and human Hsp60, as well as IL-33. Hypothetically, both host Hsp60 and IL-33 can be targeted by antibodies induced during *H. pylori cagA*+ infections, which may affect gastric inflammatory reactions.

Although the homologous sequences of *H. pylori* and several new host targets have been demonstrated by computer and proteomic analyses, more research is needed to demonstrate the role of these homologous sequences in development of pathological processes due to autoimmune responses initiated by *H. pylori* components.

DISCUSSION

In light of this review, we hypothesize that *H. pylori* possessing antigens that are similar in structure to human cells, tissues and some humoral compounds, which play an important structural and physiological role, through induction of humoral and possible cellular immune responses, may drive tissue destruction and the development a pathological inflammatory response. Chronic exposure of specific memory cells to these *H. pylori* compounds enables their sustained stimulation and transformation into effector lymphocytes, which may be involved in the autoimmune-mediated tissue destruction. Further studies and deeper analyses are necessary to demonstrate the autoimmune potential of specific *H. pylori* antigens.

REFERENCES

1 **Marshall BJ**, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; **1**: 1311-1315 [PMID: 6145023]

2 **Blaser MJ**, Atherton JC. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; **113**: 321-333 [PMID: 14755326 DOI: 10.1172/JCI200420925]

3 **Peek RM**, Crabtree JE. Helicobacter infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 2006; **208**: 233-248 [PMID: 16362989 DOI: 10.1002/path.1868]

4 **Yamaoka Y**. Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; **7**: 629-641 [PMID: 20938460 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.15]

5 **Posselt G**, Backert S, Wessler S. The functional interplay of Helicobacter pylori factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal* 2013; **11**: 77 [PMID: 24099599 DOI: 10.1186/1478-811x-11-77]

6 **Suzuki N**, Murata-Kamiya N, Yanagiya K, Suda W, Hattori M, Kanda H, Bingo A, Fujii Y, Maeda S, Koike K, Hatakeyama M. Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the Helicobacter pylori CagA oncoprotein. *Sci Rep* 2015; **5**: 10024 [PMID: 25944120 DOI: 10.1038/srep10024]

7 **Machado JC**, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; **125**: 364-371 [PMID: 12891537 DOI: 10.1016/S0016-5885(03)00899-0]

8 **Ilver D**, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; **279**: 373-377 [PMID: 9430586]

9 **Mahdavi J**, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 2002; **297**: 573-578 [PMID: 12142529]

10 **Styer CM**, Hansen LM, Cooke CL, Gundersen AM, Choi SS, Berg DE, Benghezal M, Marshall BJ, Peek RM, Borén T, Solnick JV. Expression of the BabA adhesin during experimental infection with Helicobacter pylori. *Infect Immun* 2010; **78**: 1593-1600 [PMID: 20123715 DOI: 10.1128/IAI.01297-09]

11 **Pai R**, Wyle FA, Cover TL, Itani RM, Domek MJ, Tarnawski AS. Helicobacter pylori culture supernatant interferes with epidermal growth factor-activated signal transduction in human gastric KATO III cells. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1617-1624 [PMID: 9626065]

12 **Seto K**, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H, Tamaki H. Vacuolation induced by cytotoxin from Helicobacter pylori is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* 1998; **431**: 347-350 [PMID: 9714540]

13 **Lytton SD**, Fischer W, Nagel W, Haas R, Beck FX. Production of ammonium by Helicobacter pylori mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology* 2005; **151**: 3267-3276 [PMID: 16207910 DOI: 10.1099/mic.0.28049-0]

14 **Yahiro K**, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, Niidome T, Aoyagi H, Yoshino K, Yonezawa K, Moss J, Hirayama T. Protein-

tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a Helicobacter pylori VacA receptor. *J Biol Chem* 2003; **278**: 19183-19189 [PMID: 12626515 DOI: 10.1074/jbcM300117200]

15 **Yahiro K**, Satoh M, Nakano M, Hisatsune J, Isomoto H, Sap J, Suzuki H, Nomura F, Noda M, Moss J, Hirayama T. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) mediates autophagy and apoptosis caused by Helicobacter pylori VacA. *J Biol Chem* 2012; **287**: 31104-31115 [PMID: 22822085 DOI: 10.1074/jbc.M112.387498]

16 **Cover TL**, Blanke SR. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 320-332 [PMID: 15759043 DOI: 10.1038/nrmicro1095]

17 **Covacci A**, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5791-5795 [PMID: 8516329]

18 **Tummuru MK**, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; **61**: 1799-1809 [PMID: 8478069]

19 **Crabtree JE**, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJ, Rappuoli R. Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 41-45 [PMID: 7706517]

20 **Huang JQ**, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1636-1644 [PMID: 14724815]

21 **Backert S**, Clyne M, Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by Helicobacter pylori. *Cell Commun Signal* 2011; **9**: 28 [PMID: 22044679 DOI: 10.1186/1478-811X-9-28]

22 **Higashi H**, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science* 2002; **295**: 683-686 [PMID: 11743164 DOI: 10.1126/science.1067147]

23 **Suzuki M**, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, Nagai S, Koyasu S, Gilman RH, Kersulyte D, Berg DE, Sasakawa C. Helicobacter pylori CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* 2009; **5**: 23-34 [PMID: 19154985 DOI: 10.1016/j.chom.2008.11.010]

24 **Peek RM**, Moss SF, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 863-868 [PMID: 9196252]

25 **Paziak-Domańska B**, Chmiela M, Jarosińska A, Rudnicka W. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in Helicobacter pylori infections. *Cell Immunol* 2000; **202**: 136-139 [PMID: 10896773 DOI: 10.1006/cimm.2000.1654]

26 **Censini S**, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. Cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 14648-14653 [PMID: 8962108]

27 **Backert S**, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM, König W, Meyer TF, Jungblut PR. Subproteomes of soluble and structure-bound Helicobacter pylori proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2005; **5**: 1331-1345 [PMID: 15717330 DOI: 10.1002/pmic.200401019]

28 **Olofsson A**, Vallström A, Petzold K, Tegtmeyer N, Schleucher J, Carlsson S, Haas R, Backert S, Wai SN, Gröbner G, Arnqvist A. Biochemical and functional characterization of Helicobacter pylori vesicles. *Mol Microbiol* 2010; **77**: 1539-1555 [PMID: 20659286 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x]

29 **Parker H**, Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JI. Uptake of Helicobacter pylori outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2010; **78**: 5054-5061 [PMID: 20876296 DOI: 10.1128/IAI.00299-10]

30 **Fiocca R**, Necchi V, Sommi P, Ricci V, Telford J, Cover TL, Solcia E. Release of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* 1999; **188**: 220-226 [PMID: 10398168]

31 **Heczko U**, Smith VC, Mark Meloche R, Buchan AM, Finlay BB. Characteristics of Helicobacter pylori attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes Infect* 2000; **2**: 1669-1676 [PMID: 11137040 DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01322-8]

32 **Olofsson A**, Nygård Skalman L, Obi I, Lundmark R, Arnqvist A. Uptake of Helicobacter pylori vesicles is facilitated by clathrin-dependent and clathrin-independent endocytic pathways. *MBio* 2014; **5**: e00979-e00914 [PMID: 24846379 DOI: 10.1128/mBio.00979-14]

33 **Shimoda A**, Ueda K, Nishiumi S, Murata-Kamiya N, Mukai SA, Sawada S, Azuma T, Hatakeyama M, Akiyoshi K. Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the Helicobacter pylori virulence factor CagA. *Sci Rep* 2016; **6**: 18346 [PMID: 26739388 DOI: 10.10.38/srep18346]

34 **Akada J**, Okuda M, Hiramoto N, Kitagawa T, Zhang X, Kamei S, Ito A, Nakamura M, Uchida T, Hiwatani T, Fukuda Y, Nakazawa T, Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic characterization of Helicobacter pylori CagA antigen recognized by child serum antibodies and its epitope mapping by peptide array. *PLoS One* 2014; **9**: e104611 [PMID: 25141238 DOI: 10.1371/journal.pone.0104611]

35 **Arnold IC**, Hitzler I, Engler D, Oertli M, Agger EM, Müller A. The C-terminally encoded, MHC class II-restricted T cell antigenicity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA promotes gastric preneoplasia. *J Immunol* 2011; **186**: 6165-6172 [PMID: 21518972 DOI: 10.4049/jimmunol.1003472]

36 **Shiota S**, Matsunari O, Watada M, Yamaoka Y. Serum Helicobacter pylori CagA antibody as a biomarker for gastric cancer in east-Asian countries. *Future Microbiol* 2010; **5**: 1885-1893 [PMID: 21155667 DOI: 10.2217/fmb.10.135]

37 **Tummuru MK**, Sharma SA, Blaser MJ. Helicobacter pylori picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995; **18**: 867-876 [PMID: 8825091]

38 **Yamaoka Y**, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains. *Gut* 1997; **41**: 442-451 [PMID: 9391240]

39 **Smith MF**, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 32552-32560 [PMID: 12807870 DOI: 10.1074/jbcM305536200]

40 **Grebowska A**, Moran AP, Matusiak A, Bak-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Rechciński T, Walencka M, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W, Chmiela M. Anti-phagocytic activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide (LPS)--possible modulation of the innate immune response to these bacteria. *Pol J Microbiol* 2008; **57**: 185-192 [PMID: 19004238]

41 **Grebowska A**, Moran AP, Bielanski W, Matusiak A, Rechcinski T, Rudnicka K, Baranowska A, Rudnicka W, Chmiela M. Helicobacter pylori lipopolysaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocyte cultures. *J Physiol Pharmacol* 2010; **61**: 437-442 [PMID: 20814071]

42 **Rudnicka K**, Miszczyk E, Matusiak A, Walencka M, Moran AP, Rudnicka W, Chmiela M. Helicobacter pylori-driven modulation of NK cell expansion, intracellular cytokine expression and cytotoxic activity. *Innate Immun* 2015; **21**: 127-139 [PMID: 24448078 DOI: 10.1177/1753425913]

43 **Suzuki M**, Mori M, Miyayama A, Iwai N, Tsunematsu N, Oonuki M, Suzuki H, Hibi T, Ishii H. Enhancement of neutrophil

infiltration in the corpus after failure of Helicobacter pylori eradication. *J Clin Gastroenterol* 1997; **25** Suppl 1: S222-S228 [PMID: 9479652]
44 **Bruewer M**, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; **171**: 6164-6172 [PMID: 14634132]
45 **Wroblewski LE**, Shen L, Ogden S, Romero-Gallo J, Lapierre LA, Israel DA, Turner JR, Peek RM. Helicobacter pylori dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterology* 2009; **136**: 236-246 [PMID: 18996125 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.011]
46 **Tan HJ**, Goh KL. Extragastrointestinal manifestations of Helicobacter pylori infection: facts or myth? A critical review. *J Dig Dis* 2012; **13**: 342-349 [PMID: 22713083 DOI: 10.1111/j.1751-2980.2012.00599.x]
47 **Papagiannakis P**, Michalopoulos C, Papalexi F, Dalampoura D, Diamantidis MD. The role of Helicobacter pylori infection in hematological disorders. *Eur J Intern Med* 2013; **24**: 685-690 [PMID: 23523153 DOI: 10.1016/j.ejim2013.02.011]
48 **Tiwari SK**, G M, Khan AA, Habeeb A, Habibullah CM. Chronic Idiopathic Thrombocytopenia Purpura and Helicobacter pylori Eradication: A case study. *Gastroenterology Res* 2009; **2**: 57-59 [PMID: 27956954 DOI: 10.4021/gr2009.02.1271]
49 **Zhuo WL**, Zhu B, Xiang ZL, Zhuo XL, Cai L, Chen ZT. Assessment of the relationship between Helicobacter pylori and lung cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2009; **40**: 406-410 [PMID: 19766906 DOI: 10.1016/j.arcmed.2009.05.002]
50 **Yeh JJ**, Tsai S, Wu DC, Wu JY, Liu TC, Chen A. P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during Helicobacter pylori infection. *Blood* 2010; **115**: 4247-4253 [PMID: 20097880 DOI: 10.1182/blood-2009-09-241166]
51 **Tamer GS**, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO. Helicobacter pylori seropositivity in patients with acute coronary syndromes. *Dig Dis Sci* 2009; **54**: 1253-1256 [PMID: 18770033 DOI: 10.1007/s10620-008-0482-9]
52 **El-Eshmawy MM**, El-Hawary AK, Abdel Gawad SS, El-Baiomy AA. Helicobacter pylori infection might be responsible for the interconnection between type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis. *Diabetol Metab Syndr* 2011; **3**: 28 [PMID: 22029731 DOI: 10.1186/1758-5996-3-28]
53 **Deng B**, Li Y, Zhang Y, Bai L, Yang P. Helicobacter pylori infection and lung cancer: a review of an emerging hypothesis. *Carcinogenesis* 2013; **34**: 1189-1195 [PMID: 23568955 DOI: 10.1093/carcin/bgt114]
54 **Mendall MA**, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC. Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 1994; **71**: 437-439 [PMID: 8011406 DOI: 10.1136/hrt.71.5.437]
55 **Danesh J**, Peto R. Risk factors for coronary heart disease and infection with Helicobacter pylori: meta-analysis of 18 studies. *BMJ* 1998; **316**: 1130-1132 [PMID: 9552950]
56 **Chmiela M**, Kowalewicz-Kulbat M, Miszczak A, Wisniewska M, Rechcinski T, Kolodziej K, Kasprzak J, Wadstrom T, Rudnicka W. A link between Helicobacter pylori and/or Chlamydia spp. infections and atherosclerosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **36**: 187-192 [PMID: 12738390]
57 **Chmiela M**, Gajewski A, Rudnicka K. Helicobacter pylori vs coronary heart disease - searching for connections. *World J Cardiol* 2015; **7**: 187-203 [PMID: 25914788 DOI: 10.4330/wjc.v7.i4.187]
58 **Pasceri V**, Cammarota G, Patti G, Cuoco L, Gasbarrini A, Grillo RL, Fedeli G, Gasbarrini G, Maseri A. Association of virulent Helicobacter pylori strains with ischemic heart disease. *Circulation* 1998; **97**: 1675-1679 [PMID: 9591760 DOI: 10.1161/01.CIR.97.17.1675]
59 **Park JS**, Lee SJ, Kim TH, Yeom J, Park ES, Seo JH, Jun JS, Lim JY, Park CH, Woo HO, Youn HS, Ko GH, Kang HL, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH. Gastric autoantigenic proteins in Helicobacter pylori infection. *Yonsei Med J* 2013; **54**: 1342-1352 [PMID: 24142637 DOI: 10.3349/ymj.2013.54.6.1342]
60 **Quaratino S**, Thorpe CJ, Travers PJ, Londei M. Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10398-10402 [PMID: 7479792]
61 **Oldstone MB**. Molecular mimicry as a mechanism for the cause and a probe uncovering etiologic agent(s) of autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; **145**: 127-135 [PMID: 2805785]
62 **Sfriso P**, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, Bassetto F, Doria A. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 385-395 [PMID: 20015961 DOI: 10.1189/jlb.0709517]
63 **Whitton JL**, Feuer R. Myocarditis, microbes and autoimmunity. *Autoimmunity* 2004; **37**: 375-386 [PMID: 15621561 DOI: 10.1080/08916930410001713089]
64 **Shahrizaila N**, Yuki N. Guillain-barré syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 829129 [PMID: 21197269 DOI: 10.1155/2011/829129]
65 **Wandinger K**, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenberg P, Wagner H, Wessel K, Kirchner H, Hennig H. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000; **55**: 178-184 [PMID: 10908887]
66 **Fujinami RS**, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985; **230**: 1043-1045 [PMID: 2414848]
67 **Fujinami RS**, Oldstone MB, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2346-2350 [PMID: 6300911]
68 **Ebringer A**, Baines M, Ptaszynska T. Spondyloarthritis, uveitis, HLA-B27 and Klebsiella. *Immunol Rev* 1985; **86**: 101-116 [PMID: 2412951]
69 **Negrini R**, Savio A, Poiesi C, Appelmelk BJ, Buffoli F, Paterlini A, Cesari P, Graffeo M, Vaira D, Franzin G. Antigenic mimicry between Helicobacter pylori and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology* 1996; **111**: 655-665 [PMID: 8780570]
70 **Negrini R**, Savio A, Appelmelk BJ. Autoantibodies to gastric mucosa in Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 1997; **2** Suppl 1: S13-S16 [PMID: 9432348]
71 **D'Elios MM**, Appelmelk BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. Gastric autoimmunity: the role of Helicobacter pylori and molecular mimicry. *Trends Mol Med* 2004; **10**: 316-323 [PMID: 15242679]
72 **Ge Z**, Hiratsuka K, Taylor DE. Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two Helicobacter pylori genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. *Mol Microbiol* 1995; **15**: 97-106 [PMID: 7752900 DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02224.x]
73 **Melchers K**, Weitzenegger T, Buhmann A, Steinhilber W, Sachs G, Schäfer KP. Cloning and membrane topology of a P type ATPase from Helicobacter pylori. *J Biol Chem* 1996; **271**: 446-457 [PMID: 8550601 DOI: 10.1074/jbc.271.1.446]
74 **Cover TL**, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among Helicobacter pylori strains. *J Biol Chem* 1994; **269**: 10566-10573 [PMID: 8144644]
75 **Uibo R**, Vorobjova T, Metsküla K, Kisand K, Wadström T, Kivik T. Association of Helicobacter pylori and gastric autoimmunity: a population-based study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; **11**: 65-68 [PMID: 7599605]
76 **Kansau I**, Guillain F, Thiberge JM, Labigne A. Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the Helicobacter pylori GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol* 1996; **22**: 1013-1023 [PMID: 8971721]
77 **Guarneri F**, Guarneri C, Benvenga S. Helicobacter pylori and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular

mimicry? *J Cell Mol Med* 2005; **9**: 741-744 [PMID: 16202223]
78 **Schwartz M**. Intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia. *Lancet* 1960; **2**: 1263-1267 [PMID: 13749109]
79 **Taylor KB**, Roitt IM, Doniach D, Couchman KG, Shapland C. Autoimmune phenomena in pernicious anaemia: gastric antibodies. *Br Med J* 1962; **2**: 1347-1352 [PMID: 13993616]
80 **Strickland RG**, Mackay IR. A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *Am J Dig Dis* 1973; **18**: 426-440 [PMID: 4573514]
81 **Toh BH**, van Driel IR, Gleeson PA. Pernicious anemia. *N Engl J Med* 1997; **337**: 1441-1448 [PMID: 9358143]
82 **Tomb JF**, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzegerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* 1997; **388**: 539-547 [PMID: 9252185]
83 **De Block CE**, De Leeuw IH, Van Gaal LF. High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibody-positive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 4062-4067 [PMID: 10566650]
84 **Marignani M**, Delle Fave G, Mecarocci S, Bordi C, Angeletti S, D' Ambra G, Aprile MR, Corleto VD, Monarca B, Annibale B. High prevalence of atrophic body gastritis in patients with unexplained microcytic and macrocytic anemia: a prospective screening study. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**: 766-772 [PMID: 10086664 DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.00949.x]
85 **De Block CE**, Van Campenhout CM, De Leeuw IH, Keenoy BM, Martin M, Van Hoof V, Van Gaal LF. Soluble transferrin receptor level: a new marker of iron deficiency anemia, a common manifestation of gastric autoimmunity in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; **23**: 1384-1388 [PMID: 10977038]
86 **Kokkola A**, Sjöblom SM, Haapiainen R, Sipponen P, Puolakkainen P, Järvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1998; **33**: 88-92 [PMID: 9489914]
87 **De Block CE**, De Leeuw IH, Van Gaal LF. Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: a clinically oriented review. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 363-371 [PMID: 18029461 DOI: 10.1210/jc.2007-2134]
88 **Claeys D**, Faller G, Appelmelk BJ, Negrini R, Kirchner T. The gastric H+,K+-ATPase is a major autoantigen in chronic Helicobacter pylori gastritis with body mucosa atrophy. *Gastroenterology* 1998; **115**: 340-347 [PMID: 9679039]
89 **van Driel IR**, Baxter AG, Laurie KL, Zwar TD, La Gruta NL, Judd LM, Scarff KL, Silveira PA, Gleeson PA. Immunopathogenesis, loss of T cell tolerance and genetics of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev* 2002; **1**: 290-297 [PMID: 12848983]
90 **Toh BH**, Sentry JW, Alderuccio F. The causative H+/K+ ATPase antigen in the pathogenesis of autoimmune gastritis. *Immunol Today* 2000; **21**: 348-354 [PMID: 10871877]
91 **Amedei A**, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, van der Zee R, Telford JL, Vandenbroucke-Grauls CM, D'Elios MM, Del Prete G. Molecular mimicry between Helicobacter pylori antigens and H+, K+ --adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med* 2003; **198**: 1147-1156 [PMID: 14568977 DOI: 10.1084/jem.20030530]
92 **van Driel IR**, Read S, Zwar TD, Gleeson PA. Shaping the T cell repertoire to a bona fide autoantigen: lessons from autoimmune gastritis. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**: 570-576 [PMID: 16214318 DOI: 10.1016/j.coi.2005.09.016]
93 **Ma JY**, Borch K, Sjöstrand SE, Janzon L, Mårdh S. Positive correlation between H,K-adenosine triphosphatase autoantibodies and Helicobacter pylori antibodies in patients with pernicious anemia. *Scand J Gastroenterol* 1994; **29**: 961-965 [PMID: 7871374]
94 **Faller G**, Steininger H, Kränzlein J, Maul H, Kerkau T, Hensen J, Hahn EG, Kirchner T. Antigastric autoantibodies in Helicobacter pylori infection: implications of histological and clinical parameters of gastritis. *Gut* 1997; **41**: 619-623 [PMID: 9414967]
95 **Faller G**, Steininger H, Appelmelk B, Kirchner T. Evidence of novel pathogenic pathways for the formation of antigastric autoantibodies in Helicobacter pylori gastritis. *J Clin Pathol* 1998; **51**: 244-245 [PMID: 9659270]
96 **Villako K**, Kekki M, Maaroos HI, Sipponen P, Tammur R, Tamm A, Keevallik R. A 12-year follow-up study of chronic gastritis and Helicobacter pylori in a population-based random sample. *Scand J Gastroenterol* 1995; **30**: 964-967 [PMID: 8545616]
97 **Oksanen A**, Sipponen P, Karttunen R, Miettinen A, Veijola L, Sarna S, Rautelin H. Atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection in outpatients referred for gastroscopy. *Gut* 2000; **46**: 460-463 [PMID: 10716672]
98 **Negrini R**, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Gullini S, Villanacci V, Poiesi C, Albertini A, Ghielmi S. Helicobacter pylori infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology* 1991; **101**: 437-445 [PMID: 2065920]
99 **Appelmelk BJ**, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, De Vries T, Quan H, Verboom T, Maaskant JJ, Ghiara P, Kuipers EJ, Bloemena E, Tadema TM, Townsend RR, Tyagarajan K, Crothers JM, Monteiro MA, Savio A, De Graaff J. Potential role of molecular mimicry between Helicobacter pylori lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 1996; **64**: 2031-2040 [PMID: 8675304]
100 **Simoons-Smit IM**, Appelmelk BJ, Verboom T, Negrini R, Penner JL, Aspinall GO, Moran AP, Fei SF, Shi BS, Rudnica W, Savio A, de Graaff J. Typing of Helicobacter pylori with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 2196-2200 [PMID: 8862584]
101 **Aspinall GO**, Monteiro MA, Pang H, Walsh EJ, Moran AP. Lipopolysaccharide of the Helicobacter pylori type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the O antigen chain and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* 1996; **35**: 2489-2497 [PMID: 8652593 DOI: 10.1021/bi951852s]
102 **Aspinall GO**, Monteiro MA. Lipopolysaccharides of Helicobacter pylori strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* 1996; **35**: 2498-2504 [PMID: 8652594]
103 **Heneghan MA**, McCarthy CF, Moran AP. Relationship of blood group determinants on Helicobacter pylori lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. *Infect Immun* 2000; **68**: 937-941 [PMID: 10639467]
104 **Monteiro MA**, Chan KH, Rasko DA, Taylor DE, Zheng PY, Appelmelk BJ, Wirth HP, Yang M, Blaser MJ, Hynes SO, Moran AP, Perry MB. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by Helicobacter pylori lipopolysaccharides. Molecular mimicry between h. pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11533-11543 [PMID: 9565568]
105 **Monteiro MA**, Appelmelk BJ, Rasko DA, Moran AP, Hynes SO, MacLean LL, Chan KH, Michael FS, Logan SM, O'Rourke J, Lee A, Taylor DE, Perry MB. Lipopolysaccharide structures of Helicobacter pylori genomic strains 26695 and J99, mouse model H. pylori Sydney strain, H. pylori P466 carrying sialyl Lewis X, and H. pylori UA915 expressing Lewis B classification of H. pylori lipopolysaccharides into glycotype families. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 305-320 [PMID: 10632700]
106 **Monteiro MA**, Zheng P, Ho B, Yokota S, Amano K, Pan Z, Berg DE, Chan KH, MacLean LL, Perry MB. Expression of histo-blood group antigens by lipopolysaccharides of Helicobacter pylori strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. *Glycobiology* 2000; **10**: 701-713 [PMID: 10910974]
107 **Ge Z**, Chan NW, Palcic MM, Taylor DE. Cloning and heterologous expression of an alpha1,3-fucosyltransferase gene from the

gastric pathogen Helicobacter pylori. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21357-21363 [PMID: 9261149]
108 **Rasko DA**, Wang G, Palcic MM, Taylor DE. Cloning and characterization of the alpha(1,3/4) fucosyltransferase of Helicobacter pylori. *J Biol Chem* 2000; **275**: 4988-4994 [PMID: 10671538]
109 **Wirth HP**, Yang M, Peek RM, Tham KT, Blaser MJ. Helicobacter pylori Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1091-1098 [PMID: 9322503]
110 **Moran AP**, Knirel YA, Senchenkova SN, Widmalm G, Hynes SO, Jansson PE. Phenotypic variation in molecular mimicry between Helicobacter pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewis(x) and Lewis(y) expression by H. Pylori lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5785-5795 [PMID: 11741906 DOI: 10.1074/jbc.M108574200]
111 **Appelmelk BJ**, Shiberu B, Trinks C, Tapsi N, Zheng PY, Verboom T, Maaskant J, Hokke CH, Schiphorst WE, Blanchard D, Simoons-Smit IM, van den Eijnden DH, Vandenbroucke-Grauls CM. Phase variation in Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1998; **66**: 70-76 [PMID: 9423841]
112 **Appelmelk BJ**, Martino MC, Veenhof E, Monteiro MA, Maaskant JJ, Negrini R, Lindh F, Perry M, Del Giudice G, Vandenbroucke-Grauls CM. Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2000; **68**: 5928-5932 [PMID: 10992504]
113 **Wang G**, Rasko DA, Sherburne R, Taylor DE. Molecular genetic basis for the variable expression of Lewis Y antigen in Helicobacter pylori: analysis of the alpha (1,2) fucosyltransferase gene. *Mol Microbiol* 1999; **31**: 1265-1274 [PMID: 10096092]
114 **Berg DE**, Hoffman PS, Appelmelk BJ, Kusters JG. The Helicobacter pylori genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 468-474 [PMID: 9447657]
115 **Saunders NJ**, Peden JF, Hood DW, Moxon ER. Simple sequence repeats in the Helicobacter pylori genome. *Mol Microbiol* 1998; **27**: 1091-1098 [PMID: 9570395]
116 **Tannaes T**, Dekker N, Bukholm G, Bijlsma JJ, Appelmelk BJ. Phase variation in the Helicobacter pylori phospholipase A gene and its role in acid adaptation. *Infect Immun* 2001; **69**: 7334-7340 [PMID: 11705905 DOI: 10.1128/IAI.69.12.7334-7340.2001]
117 **Appelmelk BJ**, Martin SL, Monteiro MA, Clayton CA, McColm AA, Zheng P, Verboom T, Maaskant JJ, van den Eijnden DH, Hokke CH, Perry MB, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Phase variation in Helicobacter pylori lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun* 1999; **67**: 5361-5366 [PMID: 10496917]
118 **Amano K**, Hayashi S, Kubota T, Fujii N, Yokota S. Reactivities of Lewis antigen monoclonal antibodies with the lipopolysaccharides of Helicobacter pylori strains isolated from patients with gastroduodenal diseases in Japan. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; **4**: 540-544 [PMID: 9302202]
119 **Borén T**, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; **262**: 1892-1895 [PMID: 8018146]
120 **Gerhard M**, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, Miehlke S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12778-12783 [PMID: 10535999]
121 **Edwards NJ**, Monteiro MA, Faller G, Walsh EJ, Moran AP, Roberts IS, High NJ. Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of Helicobacter pylori to the gastric epithelium. *Mol Microbiol* 2000; **35**: 1530-1539 [PMID: 10760152]
122 **Chmiela M**, Jurkiewicz M, Wiśniewska M, Czkwianianc E, Płaneta-Małecka I, Rechciński T, Rudnicka W. Anti-Lewis X IgM and IgG in H. pylori infections in children and adults. *Acta Microbiol Pol* 1999; **48**: 277-281 [PMID: 10756713]
123 **Chmiela M**, Wadstrom T, Folkesson H, Płaneta Małecka I, Czkwianianc E, Rechciński T, Rudnicka W. Anti-Lewis X antibody and Lewis X-anti-Lewis X immune complexes in Helicobacter pylori infection. *Immunol Lett* 1998; **61**: 119-125 [PMID: 9657264]
124 **Hirota K**, Kanitani H, Nemoto K, Ono T, Miyake Y. Cross-reactivity between human sialyl Lewis(x) oligosaccharide and common causative oral bacteria of infective endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; **12**: 159-164 [PMID: 8589666]
125 **Chmiela M**, Miszczyk E, Rudnicka K. Structural modifications of Helicobacter pylori lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 9882-9897 [PMID: 25110419 DOI: 10.3748/wjg.v20.i29.9882]
126 **Wirth HP**, Yang M, Karita M, Blaser MJ. Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis x and Lewis y by Helicobacter pylori isolates is related to cagA status. *Infect Immun* 1996; **64**: 4598-4605 [PMID: 8890213]
127 **Zheng PY**, Hua J, Yeoh KG, Ho B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not cagA, iceA, and vacA in Helicobacter pylori isolates in an Asian population. *Gut* 2000; **47**: 18-22 [PMID: 10861258 DOI: 10.1136/gut.47.1.18]
128 **Gasbarrini A**, Franceschi F, Tartaglione R, Landolfi R, Pola P, Gasbarrini G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 1998; **352**: 878 [PMID: 9742983]
129 **Takahashi T**, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, Okubo M, Zaitsu Y, Ariyoshi K, Nakamura Y, Nawata R, Oka Y, Shirai M, Tanizawa Y. Molecular mimicry by Helicobacter pylori CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2004; **124**: 91-96 [PMID: 14675413 DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04735.x]
130 **Stasi R**, Provan D. Helicobacter pylori and Chronic ITP. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 206-211 [PMID: 19074084 DOI: 10.1182/asheducation-2008.1.206]
131 **Cheng YS**, Kuang LP, Zhuang CL, Jiang JD, Shi M. Effects of cytotoxin-associated gene A (CagA) positive Helicobacter pylori infection on anti-platelet glycoprotein antibody producing B cells in patients with primary idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Pak J Med Sci* 2015; **31**: 121-126 [PMID: 25878627 DOI: 10.12669/pjms.311.6409]
132 **Najaoui A**, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, Sachs UJ. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol* 2012; **88**: 167-174 [PMID: 21985182 DOI: 10.1111/j.1600-0609.2011.01718.x]
133 **Johnsen J**. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; **2012**: 306-312 [PMID: 23233597 DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.306]
134 **Byrne MF**, Kerrigan SW, Corcoran PA, Atherton JC, Murray FE, Fitzgerald DJ, Cox DM. Helicobacter pylori binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation. *Gastroenterology* 2003; **124**: 1846-1854 [PMID: 12806618 DOI: 10.1016/S0016-5085(03)]
135 **Semple JW**, Aslam R, Kim M, Speck ER, Freedman J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood* 2007; **109**: 4803-4805 [PMID: 17299089 DOI: 10.1182/blood-2006-12-062695]
136 **Kuwana M**. Helicobacter pylori-associated immune thrombocytopenia: clinical features and pathogenic mechanisms. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 714-723 [PMID: 24574745 DOI: 10.3748/wjg.v20.i3.714]
137 **Rožanković PB**, Huzjan AL, Cupić H, Benčić IJ, Bašić S, Demarin V. Influence of CagA-positive Helicobacter pylori strains on atherosclerotic carotid disease. *J Neurol* 2011; **258**: 753-761 [PMID: 21085982 DOI: 10.10007/s00415-010-5824-9]
138 **Sealy-Jefferson S**, Gillespie BW, Aiello AE, Haan MN, Morgenstern LB, Lisabeth LD. Antibody levels to persistent pathogens and incident stroke in Mexican Americans. *PLoS One* 2013; **8**: e65959 [PMID: 23799066 DOI: 10.1371/journal.pone.0065959]
139 **Matusiak A**, Chałubiński M, Broncel M, Rechciński T,

Rudnicka K, Miszczyk E, Walencka M, Strapagiel D, Gajewski A, Chmiela M. Putative consequences of exposure to Helicobacter pylori infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation. *Arch Med Sci* 2016; **12**: 45-54 [PMID: 26925118 DOI: 10.5114/aoms.2015.50772]

140 **Khodaii Z**, Vakili H, Ghaderian SM, Najar RA, Panah AS. Association of Helicobacter pylori infection with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 2011; **22**: 6-11 [PMID: 20962628 DOI: 10.1097/MCA.0b013e3283402360]

141 **Kowalski M**, Rees W, Konturek PC, Grove R, Scheffold T, Meixner H, Brunec M, Franz N, Konturek JW, Pieniazek P, Hahn EG, Konturek SJ, Thale J, Warnecke H. Detection of Helicobacter pylori specific DNA in human atheromatous coronary arteries and its association to prior myocardial infarction and unstable angina. *Dig Liver Dis* 2002; **34**: 398-402 [PMID: 12132786]

142 **Akbas HS**, Basyigit S, Suleymanlar I, Kemaloglu D, Koc S, Davran F, Demir I, Suleymanlar G. The assessment of carotid intima media thickness and serum paraoxonase-1 activity in Helicobacter pylori positive subjects. *Lipids Health Dis* 2010; **9**: 92 [PMID: 20804546 DOI: 10.1186/1476-511X-9-92]

143 **Satoh H**, Saijo Y, Yoshioka E, Tsutsui H. Helicobacter Pylori infection is a significant risk for modified lipid profile in Japanese male subjects. *J Atheroscler Thromb* 2010; **17**: 1041-1048 [PMID: 20610892 DOI: 10.5551/jat.5157]

144 **Wierzbicki AS**. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res* 2007; **4**: 143-150 [PMID: 17654449]

145 **Lazzerini PE**, Capecchi PL, Selvi E, Lorenzini S, Bisogno S, Galeazzi M, Laghi Pasini F. Hyperhomocysteinemia: a cardiovascular risk factor in autoimmune diseases? *Lupus* 2007; **16**: 852-862 [PMID: 17971357 DOI: 10.1177/0961203307084176]

146 **Polyzos SA**, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The association between Helicobacter pylori infection and insulin resistance: a systematic review. *Helicobacter* 2011; **16**: 79-88 [PMID: 21435084]

147 **Christodoulou DK**, Milionis HJ, Pappa P, Katsanos KH, Sigounas D, Florentin M, Elisaf M, Tsianos EV. Association of Helicobacter pylori infection with cardiovascular disease--is it just a myth? *Eur J Intern Med* 2011; **22**: 191-194 [PMID: 21402252 DOI: 10.1016/j/ejm.2010.11.010]

148 **George J**, Afek A, Gilburd B, Harats D, Shoenfeld Y. Autoimmunity in atherosclerosis: lessons from experimental models. *Lupus* 2000; **9**: 223-227 [PMID: 10805492]

149 **Franceschi F**, Sepulveda AR, Gasbarrini A, Pola P, Silveri NG, Gasbarrini G, Graham DY, Genta RM. Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens: possible pathogenic link between Helicobacter pylori infection and atherosclerosis. *Circulation* 2002; **106**: 430-434 [PMID: 12135941 DOI: 10.1161/01.CIR.0000024100.90140.19]

150 **Dunn BE**, Phadnis SH. Structure, function and localization of Helicobacter pylori urease. *Yale J Biol Med* 1998; **71**: 63-73 [PMID: 10378351]

151 **Schoep TD**, Fulurija A, Good F, Lu W, Himbeck RP, Schwan C, Choi SS, Berg DE, Mittl PR, Benghezal M, Marshall BJ. Surface properties of Helicobacter pylori urease complex are essential for persistence. *PLoS One* 2010; **5**: e15042 [PMID: 21124783]

152 **Mobley HL**, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995; **59**: 451-480 [PMID: 7565414]

153 **Mobley HL**, Hausinger RP. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev* 1989; **53**: 85-108 [PMID: 2651866]

154 **Leal-Herrera Y**, Torres J, Perez-Perez G, Gomez A, Monath T, Tapia-Conyer R, Muñoz O. Serologic IgG response to urease in Helicobacter pylori-infected persons from Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **60**: 587-592 [PMID: 10348233]

155 **Burnie JP**, al-Dughaym A. The application of epitope mapping in the development of a new serological test for Helicobacter pylori infection. *J Immunol Methods* 1996; **194**: 85-94 [PMID: 8690944]

156 **Futagami S**, Takahashi H, Norose Y, Kobayashi M. Systemic and local immune responses against Helicobacter pylori urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites. *Gut* 1998; **43**: 168-175 [PMID: 10189839]

157 **Konieczna I**, Zarnowiec P, Kwinkowski M, Kolesinska B, Fraczyk J, Kaminski Z, Kaca W. Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2012; **13**: 789-806 [PMID: 23305365 DOI: 10.2174/138920312804871094]

158 **Arabski M**, Konieczna I, Sołowiej D, Rogoń A, Kolesińska B, Kamiński Z, Kaca W. Are anti-Helicobacter pylori urease antibodies involved in atherosclerotic diseases? *Clin Biochem* 2010; **43**: 115-123 [PMID: 19786006 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.09.16]

159 **Kansau I**, Labigne A. Heat shock proteins of Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; **10** Suppl 1: 51-56 [PMID: 8730259]

160 **Ng EK**, Thompson SA, Pérez-Pérez GI, Kansau I, van der Ende A, Labigne A, Sung JJ, Chung SC, Blaser MJ. Helicobacter pylori heat shock protein A: serologic responses and genetic diversity. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; **6**: 377-382 [PMID: 10225839]

161 **Birnie DH**, Holme ER, McKay IC, Hood S, McColl KE, Hillis WS. Association between antibodies to heat shock protein 65 and coronary atherosclerosis. Possible mechanism of action of Helicobacter pylori and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. *Eur Heart J* 1998; **19**: 387-394 [PMID: 9568442]

162 **Pockley AG**, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens* 2002; **20**: 1815-1820 [PMID: 12195124]

163 **Eamranond PP**, Torres J, Muñoz O, Pérez-Pérez GI. Age-specific immune response to HspA in Helicobacter pylori-positive persons in Mexico. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**: 983-985 [PMID: 15358663]

164 **Frulloni L**, Lunardi C, Simone R, Dolcino M, Scattolini C, Falconi M, Benini L, Vantini I, Corrocher R, Puccetti A. Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med* 2009; **361**: 2135-2142 [PMID: 19940298 DOI: 10.1056/NEJMoa0903068]

165 **Pacifico L**, Osborn JF, Tromba V, Romaggioli S, Bascetta S, Chiesa C. Helicobacter pylori infection and extragastric disorders in children: a critical update. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 1379-1401 [PMID: 24587617 DOI: 10.3749/wjg.v20.i6.1379]

166 **Fetissov SO**, Hamze Sinno M, Coëffier M, Bole-Feysot C, Ducrotté P, Hökfelt T, Déchelotte P. Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition* 2008; **24**: 348-359 [PMID: 18262391 DOI: 10.1016/j.nut.2007.12.006]

167 **Paoluzi OA**, Blanco del VG, Caruso R, Monteleone I, Monteleone G, Pallone F. Impairment of ghrelin synthesis in Helicobacter pylori-colonized stomach: new clues for the pathogenesis of H. pylori-related gastric inflammation. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 639-646 [PMID: 24574737 DOI: 10.3748/wjg.v20.i3.639]

168 **Roper J**, Francois F, Shue PL, Mourad MS, Pei Z, Olivares de Perez AZ, Perez-Perez GI, Tseng CH, Blaser MJ. Leptin and ghrelin in relation to Helicobacter pylori status in adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 2350-2357 [PMID: 18397989 DOI: 10.1210/jc.2007-2057]

169 **Plonka M**, Bielanski W, Konturek SJ, Targosz A, Sliwowski Z, Dobrzanska M, Kaminska A, Sito E, Konturek PC, Brzozowski T. Helicobacter pylori infection and serum gastrin, ghrelin and leptin in children of Polish shepherds. *Dig Liver Dis* 2006; **38**: 91-97 [PMID: 16293448 DOI: 10.1016/j.dld.2005.10.013]

170 **Ariyasu H**, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 4753-4758 [PMID: 11600536]

171 **Konturek PC**, Brzozowski T, Pajdo R, Nikiforuk A, Kwiecien S, Harsch I, Drozdowicz D, Hahn EG, Konturek SJ. Ghrelin-a new

gastroprotective factor in gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol* 2004; **55**: 325-336 [PMID: 15213356]

172 **Kusminski CM**, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci* (Lond) 2005; **109**: 243-256 [PMID: 16104844 DOI: 10.1042/CS20050078]

173 **Al-Suhaimi EA**, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res* 2013; **18**: 12 [PMID: 23634778 DOI: 10.1186/2047-783X-18-12]

174 **Stawerska R**, Czkwianianc E, Matusiak A, Smyczyńska J, Hilczer M, Chmiela M, Lewiński A. Assessment of ghrelin, leptin, orexin A and alpha-MSH serum concentrations and the levels of the autoantibodies against the aforementioned peptides in relation to Helicobacter pylori infections and Candida albicans colonization in children with short stature. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2016; **21**: 102-110 [PMID: 27275765 DOI: 10.18544/PEDM-21.03.0031]

175 **Stawerska R**, Czkwianianc E, Matusiak A, Smyczyńska J, Hilczer M, Chmiela M, Lewiński A. Prevalence of autoantibodies against some selected growth and appetite-regulating neuropeptides in serum of short children exposed to Candida albicans colonization and/or Helicobacter pylori infection: the molecular mimicry phenomenon. *Neuro Endocrinol Lett* 2015; **36**: 458-464 [PMID: 26707047]

176 **Buzzelli JN**, Chalinor HV, Pavlic DI, Sutton P, Menheniott TR, Giraud AS, Judd LM. IL33 Is a Stomach Alarmin That Initiates a Skewed Th2 Response to Injury and Infection. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015; **1**: 203-221.e3 [PMID: 28210674 DOI: 10.1016/j.jcmgh.2014.12.003]

177 **Pei C**, Barbour M, Fairlie-Clarke KJ, Allan D, Mu R, Jiang HR. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology* 2014; **141**: 9-17 [PMID: 24116703 DOI: 10.1111/imm.12174]

P- Reviewer: Balaban YH, Franceschi F, Vilaichone RK, Yamaoka Y, Youn HS **S- Editor**: Gong ZM **L- Editor**: A **E- Editor**: Wang CH

Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA
Telephone: +1-925-223-8242
Fax: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
Help Desk: http://www.f6publishing.com/helpdesk
http://www.wjgnet.com

ISSN 1007-9327

© 2017 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

APMIS JOURNAL OF PATHOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

APMIS 127: 139–149

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd.

DOI 10.1111/apm.12925

Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *Helicobacter pylori* HspB in *H. pylori*-infected patients

WERONIKA GONCIARZ,[1] AGNIESZKA MATUSIAK,[1] KAROLINA RUDNICKA,[1] TOMASZ RECHCIŃSKI,[2] MACIEJ CHAŁUBIŃSKI,[3] ELŻBIETA CZKWIANIANC,[4] MARLENA BRONCEL,[5] ADRIAN GAJEWSKI[1] and MAGDALENA CHMIELA[1]

[1]Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz; [2]Department of Cardiology Biegański Regional Speciality Hospital, Medical University of Łódź; [3]Clinic of Immunology, Rheumatology and Allergy of the Medical University of Lodz; [4]Department of Gastroenterology and Pediatrics, Polish Mother's Memorial Hospital; and [5]Department of Internal Diseases and Clinical Pharmacology, Laboratory of Tissue Immunopharmacology, Biegański Regional Speciality Hospital, Medical University of Łódź, Łódź, Poland

Gonciarz W, Matusiak A, Rudnicka K, Rechciński T, Chałubiński M, Czkwianianc E, Broncel M, Gajewski A, Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *Helicobacter pylori* HspB in *H. pylori*-infected patients. APMIS 2019; 127: 139–149.

Helicobacter pylori (Hp) may initiate autoimmunity as a result of molecular mimicry. The aim of this study was to compare the level of IgG antibodies to a specific epitope (P1 peptide) of human heat shock protein (Hsp)60 homologous to Hp Hsp60 (HspB) in the sera of healthy donors (HD), patients with Hp-related gastritis or coronary heart disease (CHD), uninfected or with Hp infection confirmed by rapid urease test, histological examination (dyspeptic patients) the ^{13}C urea breath test (^{13}C UBT), and anti-Hp antibodies (healthy donors, CHD patients). The Anti-P1 IgG induction by Hp was verified by adsorption of sera with these bacteria and by experimental immunization of *Caviae porcellus* with Hp. Cytokine secretion by THP-1Blue™ monocytes in response to P1 was also assessed. Anti-P1 antibodies were detected in patients with gastritis or CHD infected with Hp and they were not found in uninfected individuals or asymptomatic carriers. No antibodies were raised against P2 in any group. Reduced cross-reactivity to P1 was exhibited by sera adsorbed with Hp. *Caviae porcellus* infected with Hp produced anti-P1 autoantibodies. THP-1XBlue™ monocytes responded to P1 by production of proinflammatory cytokines. Autoantibodies against P1 in Hp-positive patients with gastritis or CHD and upregulation of proinflammatory cytokines by P1 may contribute to the pathogenesis of Hp infection.

Key words: Antigenic mimicry; *Helicobacter pylori*; HspB; human Hsp60; gastritis; atherogenesis.

Magdalena Chmiela, Department of Immunology and Infectious Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Poland. e-mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

Helicobacter pylori which are Gram-negative rods, colonize the gastric epithelium of humans and if not eradicated, can persist for the whole life constituting a risk factor of excessive inflammatory response potentially leading to gastric or duodenal ulcers, chronic gastritis and even mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma or gastric cancer (1–3). The role of *H. pylori* in extragastric diseases including immune thrombocytopenic purpura (ITP), iron deficiency anemia (IDA), vitamin B12 deficiency, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, dermatological and neurologic disorders as well as lung cancer was suggested (4–8). One concept links these extragastric diseases with molecular mimicry between human and *H. pylori* compounds released from lysed bacteria (8, 9), which destroy the gastric barrier and induce humoral and cellular immune responses deleterious to the host (10). A well-documented example of cross-reactivity caused

Received 24 September 2018. Accepted 27 December 2018

by antigenic mimicry is Guillan-Barre Syndrome, a neurodegenerative disease linked to *Campylobacter jejuni* infection (11).

Helicobacter pylori infection, which can be initiated by colonization of oral cavity and then gastric mucosa may become chronic and can destroy the host gastric tissue progressively (12). *Helicobacter pylori* have developed several strategies to diminish the efficiency of innate and specific adaptive immune responses (13–16). The induction of anti-self reactions by *H. pylori* has been suggested when antibodies reacting with the gastric antral mucosa were detected in the sera of infected patients (17). Several examples of molecular mimicry between *H. pylori* and host compounds have been shown: vacuolating cytotoxin A (VacA) and urease beta chain vs gastric H+K+-ATPase (18, 19), heat shock protein (Hsp)A vs host GroEs, HspB vs host Hsp60, hemaglutinin/protease (hap) vs host carbonic anhydrase (20, 21). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide (LPS), which expresses Lewis X and Lewis Y blood group antigens inducing antibodies, which bind Lewis antigens in gastric mucin and gastric H+K+-ATPase (22–25). Another study showed the cross-reactivity between platelet-associated immunoglobulin G (PAIgG) and *H. pylori* cytotoxin associated gene A (CagA) protein (26). The interaction of anti-CagA antibodies with cytoplasmic and nuclear antigens of smooth muscle cells in vessels with signs of atherosclerosis was shown (27). A significant correlation between the level of antibodies recognizing the 8-mer synthetic peptide corresponding to the UreB minimal flap epitope of *H. pylori* urease and atherosclerosis symptoms has been found (28).

In response to infections a beneficial protective immune response toward Hsp60 is initiated in all humans and is additional to the immunity toward specific microbial epitopes. Hsp60, which in physiological conditions has intracellular localization, in response to stress conditions, including the exposure to LPS or oxidized low density lipoprotein (oxLDL), during atherogenesis is upregulated and becomes cell surface exposed. It can be targeted by preexisting autoantibodies and Hsp60 specific T lymphocytes triggered by infectious agents, both of which can induce cytotoxic effects (29–33).

The aim of this study was to compare the level of IgG antibodies to human Hsp60 in the sera of healthy donors, patients with *H. pylori* related gastritis or coronary heart disease, infected or not infected with *H. pylori*. The prevalence and the levels of IgG toward synthetic peptide (P1) containing the sequence present in human Hsp60 and in *H. pylori* Hsp60 (HspB) (aa:112-121, aa sequence: TTT**ATVLA**RS) or to control peptide (P2) without such a sequence (aa:122-131, aa sequence: IAKEGFEKIS) were studied. To know whether cross-reacting antibodies can be initiated by *H. pylori*, we used the sera non-adsorbed or adsorbed with heat inactivated *H. pylori*. We developed a *Caviae porcellus* model of experimental *H. pylori* infection to see whether chronic colonization of gastric mucosa results in the production of anti – TTT**ATVLA**RS antibodies. We also used a cellular model of THP-1XBlue™ monocytes to assess the ability of P1 to induce the production of inflammatory cytokines: tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin (IL)-1, IL-2 and IL-12.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

The informed consent was obtained for experimentation and the right to privacy of participants was guaranteed. Patients with CHD were under the care of the 2nd Cardiology Clinic of Bieganski Regional Hospital (Medical University of Lodz, Poland), and the Department of Internal Diseases and Clinical Pharmacology (Medical University of Lodz, Poland). The group in which the disease was confirmed by coronary radiography consisted of 100 individuals of both sexes. The inclusion criteria for the CHD group were as follows: arterial hypertension (intake of antihypertensive drugs prior to enrolment, systolic blood pressure >140 or diastolic blood pressure >90 mm Hg), diabetes (glucose-reducing agents or insulin intake prior to enrolment), fasting glucose level (>126 mg/dL (7 mmol/l) double checked), glycosylated hemoglobin (Hb) level (>7% or positive oral glucose tolerance test with 75 g glucose), dyslipidemia (hypolipidemic agents intake prior to enrolment), hyperlipidemia: total cholesterol level (>190 mg/dL (5.0 mmol/L), LDL cholesterol level (>115 mg/dL (3.0 mmol/L)), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (<40 mg/dL (1.0 mmol/dL)), or triglycerides (>150 mg/dL (1.2 mmol/L), obesity measured by the body mass index (BMI) (>32), nicotinism. Demographic and clinical characteristics of the CHD group were as follows: age range 38–81 (mean age 59.7 ± 7.4, males 73.9%), arterial hypertension 59.7%, systolic/diastolic blood pressure range 100-195/60-115 (mean 130 ± 21/mean 79 ± 11, diabetes mellitus type 1/2 0/22.8%, smoking 40.2%, obesity 13.0%, BMI range 19.1–37.4 (mean 27.2 ± 3.9), gastric/duodenal ulcer disease 6.4%, dyslipidemia 59.7%, total cholesterol range 37–347 (mean 205 ± 49), LDL range 38–243 (mean 132 ± 48), HDL range 19–80 (mean 43 ± 11), triglycerides range 37–478 (mean 148 ± 77), history of myocardial infarction (85.8%), history of stroke (6.38%), infarction (85.8%), primary coronary angioplasty (68.5%). Healthy donors, the control group, (47 individuals of both sexes, mean age 56.5 ± 5.2, males 65.9%), with a negative history of cardiovascular and gastric/duodenal ulcer diseases were recruited from the basic health care unit in Lodz and were selected on the basis of the exclusion of classic CHD risk factors: arterial hypertension, hyperlipidemia, diabetes, smoking, obesity as well as dyspepsia, abdominal pain or gastric bleeding. The *H. pylori* status in healthy donors and CHD patients was estimated by the

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

^{13}C urea breath testing (^{13}C UBT) (34), immunoblot for anti-*H. pylori* IgG (Milenia®Blot *H. pylori*, DPC Biermann, GmbH, Bad Nanheim, Germany), and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG against the *H. pylori* antigenic complex called a glycine extract (GE) (35). In patients with gastritis *H. pylori* infection was confirmed by endoscopy-based methods: rapid urease testing and the presence of *Helicobacter*-like organisms (HLO) in gastric tissue sections. This group, which consisted of 22 individuals of both sexes (mean age 45.5 ± 4.2, males 63.6%) under the care of Polish Mother's Memorial Hospital – Research Institute in Lodz, was controlled for anti-GE IgG and all patients had a negative history of CHD.

Blood samples were collected in a fasting state, on admission, before the medical and pharmacological intervention. The routine laboratory tests: total cholesterol, lipoprotein fractions (LDL, HDL), triglycerides as well as glucose and glycosylated Hb levels were evaluated in fresh blood samples using an automatic analyzer (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Serum was obtained within 1 h, by 30 min incubation at room temperature and subsequent 30 min incubation at 4 °C followed by centrifugation (2000 *g*, 10 min, 4 °C). The sera were aliquoted, stored at −80 °C and thawed directly before experiments.

ELISA for anti-*H. pylori* IgG

The ELISA assay for anti-*H. pylori* IgG was performed using an *H. pylori* antigenic complex – glycine acid extract GE, from the reference *H. pylori* strain CCUG (Culture Collection University of Gothenburg, Sweden) 17874, CagA and VacA positive, as previously described (36). Major proteins in GE recognized by the reference sera from *H. pylori*-infected patients were as follows: 120 kDa (CagA), 87 kDa (VacA), 66 kDa (UreB), 60 kDa (Hsp), 29 kDa (UreA), between 66 and 22 kDa. The GE protein concentration was 600 μg/mL (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, ThermoScientific, Wlatman, WY, USA), whereas LPS content <0.001 EU/mL of LPS, as shown by the chromogenic *Limulus amebocyte* lysate test (Lonza, Braine-Alleud, Belgium).

Evaluation of IgG against recombinant human Hsp60 and soluble Hsp60 in human sera

IgG against human recombinant Hsp60 was evaluated by commercial ELISA, with the sensitivity 2.88 ng/mL (Stressgen, Ann Arbour, MI, USA): 36 healthy donors, 22 patients with *H. pylori*-related gastritis, and 40 CHD patients. Soluble Hsp60 was quantified by commercial ELISA, with the sensitivity 3.125 ng/mL (Hsp ELISA Kit, Stressgen, Plymouth Meeting, PA, USA).

Animal model of *H. pylori* infection

Adult, 3-month-old, 400–600 g of weight, male Himalayan guinea pigs (*Caviae porcellus*), (n = 47) were bred in the Animal House at the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź (Poland), kept in standard cages with free access to drinking water and fed with standard chow. Experiments were carried out in accordance with European Union Directive 2010/63/EU and approved by the Local Ethics Committee LKE9 (Decision 58/ŁB45/2016). *Helicobacter pylori* infection was developed as previously described (16). Infected animals were euthanized 1 week or 28 days after inoculation with *H. pylori*. The same time points were used for non-infected animals. The gastric tissue and blood samples were collected for microbiological (culture of *H. pylori*), histological (Giemsa and Mayer's hematoxylin staining, qualification for *Helicobacter*-like organisms-HLO and inflammation), molecular (polymerase chain reaction – PCR for *ureC* and *cagA* sequences) and serological testing (anti-*H. pylori* IgG) (16, 36). Gastric epithelial cell turnover was assessed using anti-Ki-67 antibody (MIB-1 clone; Dako, Glostrup, Denmark) toward the nuclear antigen Ki-67. Proliferation index was defined as the proportion of positively stained cells in *H. pylori* infected vs control animals. *Helicobacter pylori* antigens in stool samples were detected by the commercial immunoenzymatic test (Immundiagnostik AG, Benshei, Germany).

Bioinformatics analysis

Amino acid sequence similarity between *H. pylori* and human proteins was analyzed by the Basic Local Alignment Search Tool (Blast). It showed that human Hsp60 (GenBank protein number: P10809.2) contains the ATVLA region, which is also present in *H. pylori* HspB (GenBank protein number: AAL86900.1).

Synthetic peptides

Two synthetic peptides: P1 – containing a common amino acid sequence in human Hsp60 and *H. pylori* Hsp60-HspB (aa: 112-121, aa sequence: TTT**ATVLA**RS) and P2 – without this region (aa: 122-131, aa sequence: IAKEGFEKIS), were synthesized by Lipopharm, Gdańsk, Poland.

ELISA for anti-P1 and anti-P2 IgG

Synthetic proteins P1 and P2 were diluted in carbonate buffer (pH 9.6) and applied to the wells of 96-well microtitration plates (10 μg/mL, 100 μL/well), for 18 h at 4 °C. The wells were emptied, washed three times with phosphate buffered saline (PBS) with 0.05% Tween 80 (PBS/Tween, 250 μL/well), blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS/Tween – BSA/PBS/Tween (300 μL/well) for 2 h, at room temperature and washed five times. Serum diluted 1:50 in BSA/PBS/Tween was added to the wells (100 μL/well). In some experiments, the serum samples adsorbed with heat-killed *H. pylori* (80 °C, 1 h) were used. The plates with the sera were incubated at 37 °C, for 1 h and then washed. The appropriate secondary antibody, toward human or guinea pig immunoglobulins (Ig) G, labeled with horseradish peroxidase (HRP) (Dako, Glostrup, Denmark), diluted in BSA/PBS/Tween was added to the wells (100 μL/well). After 1 h at 37 °C, the plates were washed and treated with the staining solution (1 mg OPD/mL phosphate-citrate buffer, pH 5.0 with 0.5 μL/mL 30% H_2O_2), 100 μL/well. The color reaction was developed for 20 min in the dark and then stopped with 0.5 M citric acid (50 μL/well). The absorbance was measured at 450 nm using the Victor 2 multifunction reader (Wallac, Turku, Finland). *Cut – off* absorbance –

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

optical density (OD) 450 equal to 0.3 was defined on the basis of measurements for control wells, which were coated with the antigens and developed with labeled antibodies. In some experiments, the sera adsorbed twice with the reference strain of *H. pylori* were used as previously described (37).

Activation and cytokine secretion by THP-1X Blue™ monocytes

THP-1XBlue™ cells derived from the human monocyte cell line THP-1 (Invitrogen, SanDiego, CA, USA) are NF-κB-reporter cells. Activation of the transcription factor NF-kappaB resulted in the secretion of embryonic alkaline phosphatase (SEAP), which can be detected spectrophotometrically using the Quanti-Blue reagent. The cells were maintained in RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin, 100 mg/mL normocin, and 200 mg/mL zeocin, at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 and 95% air. The cell viability assessed by trypan blue exclusion was in the range 95–99%. The cells were placed in 96-well tissue culture plates (5×10^5 cells/mL), and incubated for 24 h under the conditions as above in the milieu of P1 or P2 (concentration range 1–100 μg/mL). The untreated cells served as negative control (RMPI-1640), whereas cells treated with *Escherichia coli* LPS (1 μg/mL) were a positive control. At the end point, 20 μL of cell culture supernatants were added to 180 μL of chromogen-substrate solution (Quanti-Blue reagent), and the SEAP activity as a marker of cell activation was assessed after 2 h. The OD_{620} values were measured in Victor^2 (Wallac, Turku, Finland). The experiments were repeated four times in triplicate for each sample and control. The cell activity was also assessed on the level of cytokines (TNF-α, IL-1, IL-2 and IL-12) concentration in cell culture supernatants using commercial ELISA (Elabscience, Houston, TX, USA).

Statistical analyses

Differences between the two groups were assessed by the Mann–Whitney *U* test and for more than two groups by the Kruskal–Wallis ANOVA test. A value of $p < 0.05$ was considered significant. Data are presented as mean values ± standard deviation (SD). For statistical analysis, the STATISTICA 10 PL software was used (Stat Soft, Poland).

RESULTS

Screening of human sera for anti-Hsp60 IgG and Hsp60

Anti-Hsp60 IgG against a complete molecule was detected in all sera from healthy donors seronegative for anti-*H. pylori* IgG, patients with gastritis seropositive for anti-*H. pylori* IgG, patients with CHD not exposed or exposed to *H. pylori* (negative or positive for anti-*H. pylori* IgG), respectively Fig. 1. The levels of anti-Hsp60 IgG were similar in healthy *H. pylori* uninfected donors, *H. pylori* infected patients with gastritis and in CHD patients seronegative for anti-*H. pylori* antibodies. Only the sera from CHD patients seropositive for anti-*H. pylori* GE IgG contained significantly elevated levels of anti-Hsp60 IgG ($p < 0.05$ in the non-parametric Mann–Whitney *U* test). Higher levels of soluble Hsp60 were demonstrated in CHD vs non-CHD individuals, 27.05 ± 26.93 ng/mL and 13.10 ± 7.90 ng/mL, respectively, $p < 0.05$ in the non-parametric Mann–Whitney *U* test.

Anti-P1 and anti-P2 IgG vs anti-GE IgG in healthy donors, patients with gastritis or CHD

Of the 47 sera from healthy donors, 26 did not contain anti-GE IgG (Fig. 2Ai). These subjects were defined as truly *H. pylori* negative and the presence of anti-GE antibodies in 21 healthy donors confirmed the *H. pylori* infection, which, however was asymptomatic (Fig. 2Aii). Healthy donors, seropositive or seronegative for anti-*H. pylori* GE IgG, did not produce anti-P1 and anti-P2 antibodies. (Fig. 2Ai, Aii). By comparison, all 22 sera from the patients with gastritis were positive for anti-*H. pylori* GE IgG and anti-P1 but not for anti-P2 IgG (Fig. 2Biii). In the CHD group, the patients who

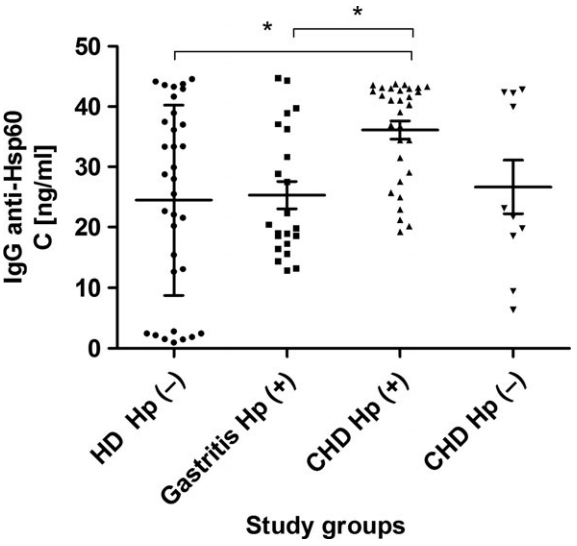


Fig. 1. Prevalence and levels of anti-human heat shock protein (Hsp) 60 IgG antibodies in human sera. Healthy donors (HD) non-infected with *Helicobacter pylori* – Hp (–), n = 26; patients with *H. pylori* related gastritis seropositive for anti-*H. pylori* antibodies – Hp (+), n = 22; patients with coronary heart disease (CHD) seropositive for anti-*H. pylori* antibodies –Hp (+), n = 30; CHD patients seronegative for anti-*H. pylori* antibodies – Hp (–), n = 10. Shown are mean values ± standard deviation (SD). Statistical significance: *($p < 0.05$) was determined by the non-parametric Mann–Whitney *U* test.

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

were seronegative for anti-GE IgG (10 individuals) were also seronegative for anti-P1 and anti-P2 IgG (Fig. 2Bi). By comparison, 90 sera of the CHD patients, who were positive for anti-GE IgG were also positive for anti-P1 IgG but not for anti-P2 IgG (Fig. 1Cii). The level of anti-P1 IgG showed as OD 450 was significantly higher in the *H. pylori* positive CHD patients than in *H. pylori* infected patients with gastritis ($p < 0.05$ in the non-parametric Mann–Whitney *U* test), (Fig. 2Bii, Aiii). The level of anti-P1 IgG in selected sera from patients with *H. pylori*-related gastritis and the CHD patients seropositive for anti-*H. pylori* antibodies was significantly diminished after the adsorption of the sera with *H. pylori* ($p < 0.05$ in the non-parametric Mann–Whitney *U* test), (Fig. 2Ci, Cii).

Anti-*H. pylori* and anti-P1 antibody production in response to experimental *H. pylori* infection in *Caviae porcellus*

Anti-P1 but not anti-P2 IgG were produced only in the animals exposed to *H. pylori*, 7 and 28 days after inoculation (Fig. 3). The level of anti-P1 IgG after 28 days was significantly higher ($p < 0.05$ in the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA tests)

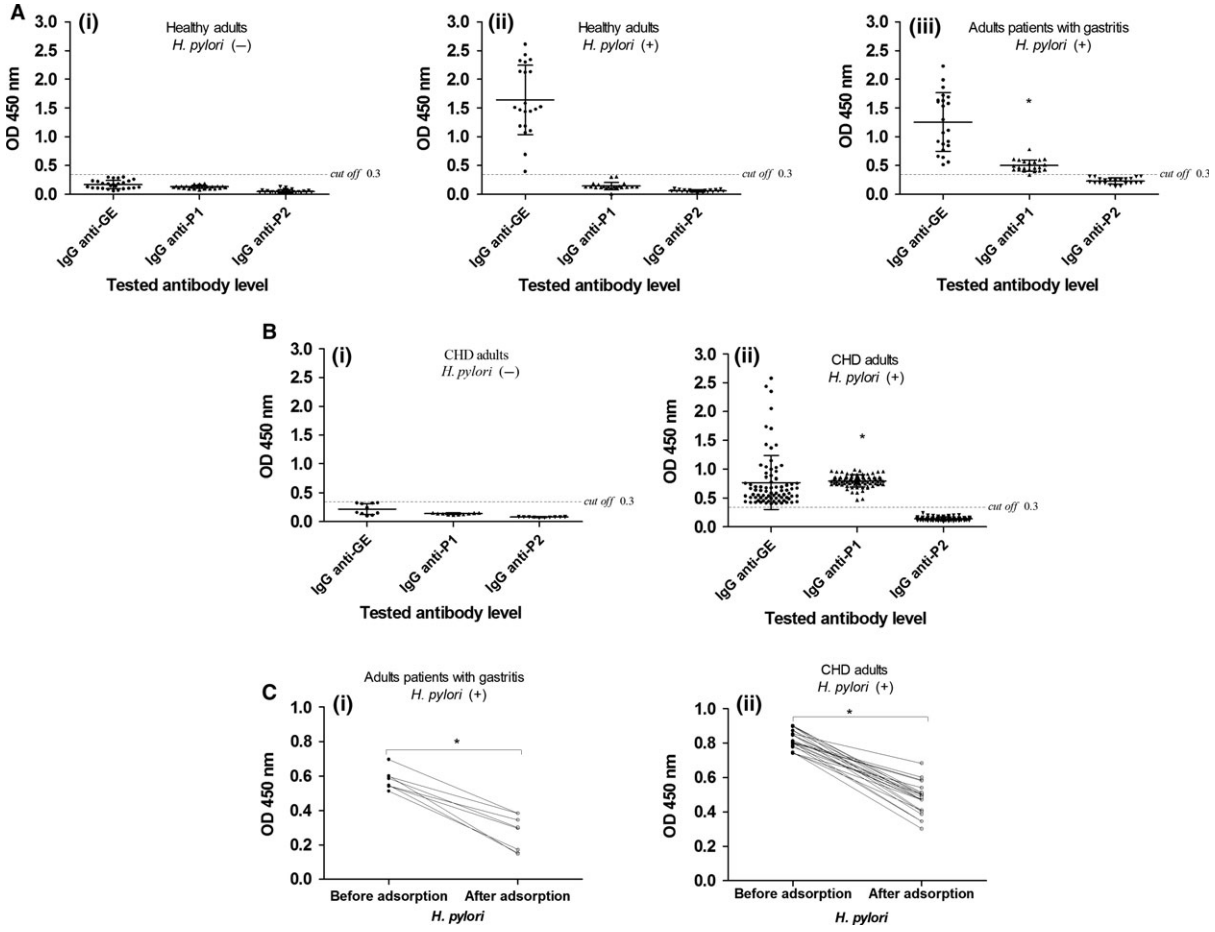


Fig. 2. Prevalence and the levels of anti-GE, anti-P1 and anti-P2 IgG in human sera. (A) (i) healthy donors seronegative – *Helicobacter pylori* (–) or (ii) seropositive – *H. pylori* (+) for anti-*H. pylori* antibodies, (iii) patients with *H. pylori* related gastritis, seropositive for anti-*H. pylori* antibodies – *H. pylori* (+), B (i) – patients with coronary heart disease (CHD) seronegative for anti-*H. pylori* antibodies – *H. pylori* (–), (ii) CHD patients seropositive for anti-*H. pylori* antibodies – *H. pylori* (+), C – level of anti-P1 IgG in human sera before and after adsorption with the heat inactivated reference *H. pylori* strain (i) – patients with *H. pylori* induced gastritis, seropositive for anti-*H. pylori* antibodies – *H. pylori* (+), (ii) – CHD seropositive for anti-*H. pylori* antibodies – *H. pylori* (+), P1 – synthetic peptide containing the amino acid sequence (TTT**ATVLA**RS) common to human heat shock protein (Hsp) 60 and *H. pylori* HspB; P2 – control synthetic peptide (IAKEGFEKIS). Statistical significance: *($p < 0.05$) was determined by the non-parametric Mann–Whitney *U* test. *The statistically significant difference between the level of anti-P1 antibodies in patients with gastritis, *H. pylori* (+) vs CHD patients *H. pylori* (+).

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

than 7 days post-infection. Anti-P1 IgG in infected animals was produced parallelly with anti-*H. pylori* GE IgG, 7 (OD 450 1.5 ± 0.397) and 28 (OD 450 2.09 ± 0.059) days after inoculation vs control animals (0.29 ± 0.043), ($p < 0.05$ in the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA tests). In *H. pylori*-infected animals, chronic gastritis was confirmed by histological examination of tissue specimens. The intensity of gastric epithelial cell proliferation estimated by Ki67 immunohistochemical staining was twice as high in infected as in uninfected animals.

Activation of THP-1XBlue™ monocytes

Due to the enzymatic activity of SEAP, the cells propagated in the milieu of P1 at 75–100 μg/mL were activated, leading to an increased level of OD620 as compared to untreated cells ($p < 0.05$ in the non-parametric Mann–Whitney *U* test), (Fig. 4Ai, ii). The cell activation in response to P1 concentration was confirmed by the significant production of TNF-α, IL-1, IL-2 and IL-12 in a dose-dependent manner ($p < 0.05$ in the non-parametric Mann–Whitney *U* test) (Fig. 4Bi, Bii, Biii, Biv). THP-1XBlue™ monocytes did not undergo activation when propagated in the milieu of P2.

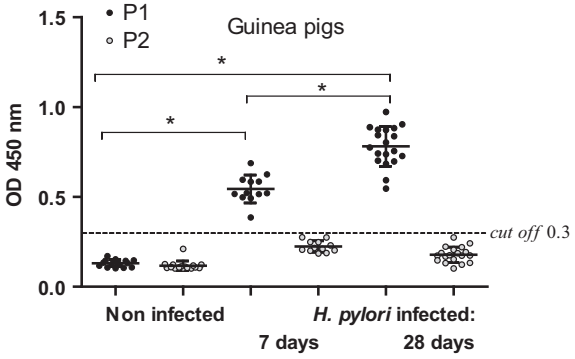


Fig. 3. Prevalence and levels of anti-P1 and anti-P2 antibody production in guinea pigs with experimental *Helicobacter pylori* infection. The sera were collected from control animals non-infected with *H. pylori*, n = 16 and from *H. pylori*-infected animals, 7 days, n = 12, and 28 days, n = 19 after the challenge with *H. pylori*. P1 – synthetic peptide with the amino acid sequence (TTT**ATV-LA**RS) common to human heat shock protein (Hsp) 60 and *H. pylori* HspB; P2 – control synthetic peptide (IAKEGFEKIS). Shown are mean values ± standard deviation (SD). Statistical significance: *($p < 0.05$) was determined by the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA test. *The statistically significant differences beetween *H. pylori* infected vs uninfected animals or in *H. pylori* infected animals 7 vs 28 days post-infection, respectively.

DISCUSSION

Among infectious agents, *Chlamydophila pneumoniae*, *H. pylori* and also viruses are often typed as a source of cross-reacting exogenous antigens, whereas oxLDL, phospholipids and Hsp60 as human autoantigens potentially involved in atherogenesis (4, 8, 30). Hsp60 of bacterial origin induces host immune responses to fight infection, whereas autologous Hsp60 should remain tolerated. Under stress conditions caused by infection this tolerance can be broken and anti-Hsp60 immune response can be directed toward human Hsp60 (38, 39).

In this study, we focused on the relation between *H. pylori* infection and CHD in terms of antibody production to the common sequence (TTT**ATV-LA**RS) of human Hsp60 and *H. pylori* HspB. IgG to human Hsp60 were detected in the sera of healthy donors seronegative for anti-*H. pylori* IgG, patients with gastritis as well as CHD individuals seronegative or seropositive for anti-*H. pylori* IgG. Only in the CHD patients infected with *H. pylori* the level of anti-Hsp60 IgG was significantly increased as compared to the other groups. In the CHD group, the serum levels of soluble Hsp60 were higher than in the non-CHD individuals, which was consistent with other studies (30). In CHD patients, the classic risk factors of atherosclerosis such as oxLDL or bacterial LPS may induce endothelial stress response, which correlates with the expression of alarming molecules, including IL-8, IL-33 and Hsp60 (39, 40). In other studies, the proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide binding protein (LBP) were elevated in CHD patients infected with *H. pylori* and showed the mobilization of the host immune system (4, 37). In this study, in the CHD patients the levels of CRP were higher as compared to the non-CHD patients. It is possible that the immune cells of CHD patients infected with *H. pylori* carrying HspB similar to human Hsp60 may respond by anti-Hsp60 antibody production and breaking tolerance against autologous Hsp60. Due to the intake of low doses of acetylsalicylic acid by CHD patients, which impairs the gastric epithelial homeostasis, the risk of *H. pylori* infection can be increased (10, 41). Hsp60, which is upregulated in atherogenic lesions can be targeted by anti-Hsp60 IgG or Hsp60 specific T cells *in situ* and in the blood stream. Both T cell and complement-dependent cytotoxicity can promote deleterious inflammatory response in CHD patients. In the inflammatory milieu Hsp60 might be modified by metalloproteinases and become immunogenic (42, 43).

Bioinformatic analysis showed that the TTT**A TVLARS** sequence (P1) is a common epitope in

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

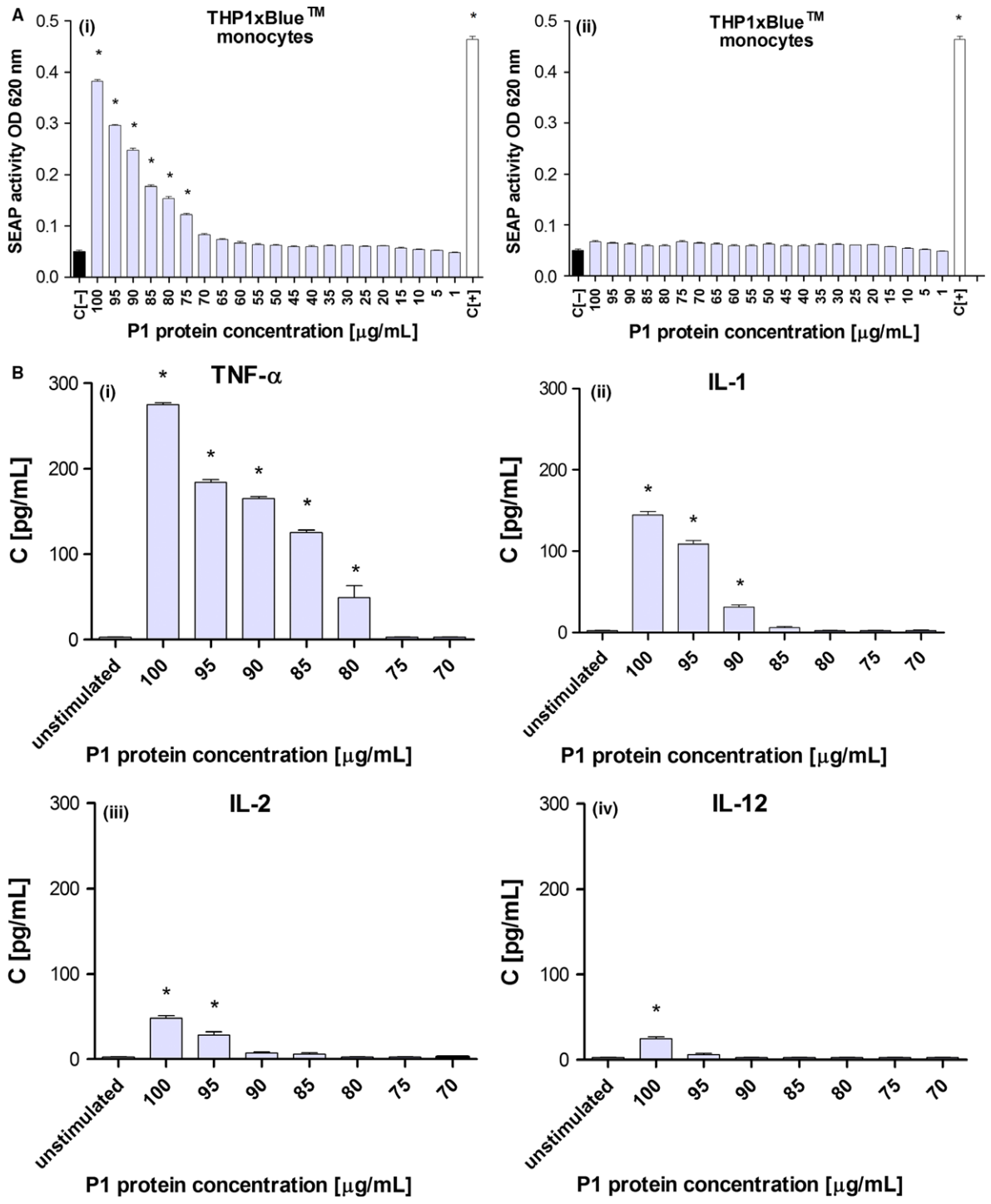


Fig. 4. Activation of THP-1XBlue™ cells. Embryonic alkaline phosphatase (SEAP) secretion in response to P1 or P2 peptide (A). Cytokine production in response to P1 (B). TNF-α – tumor necrosis factor alpha, IL-interleukin, C(-) – negative control (RPMI-1640), C(+)-positive control (*E. coli* lipopolysaccharide – LPS), P1-synthetic peptide containing the amino acid sequence (TTT**ATVLA**RS) common to human heat shock protein Hsp60 and *H. pylori* Hsp60 (HspB), P2-control synthetic peptide (IAKEGFEKIS). Shown are mean values ± standard deviation (SD). Statistical significance: *($p < 0.05$) was determined by the non-parametric Mann–Whitney *U* test. *The statistically significant differences between the cells untreated or treated with P1 peptide.

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

human Hsp60 and *H. pylori* HspB. We found anti-P1 IgG in the sera of the patients with *H. pylori* related gastritis and in the CHD patients seropositive for anti-*H. pylori* IgG. The level of anti-P1 IgG was even higher in the CHD patients exposed to *H. pylori* than in patients with gastritis. This can be explained by increased systemic inflammatory response in CHD patients, which may be related to obesity and diabetes. The lack of anti-P1 IgG in the sera of the *H. pylori* seropositive but asymptomatic healthy donors seems to confirm the role of local inflammatory response in driving immune response toward P1. In this study most healthy controls had measurable anti-Hsp60, yet had no anti-P1 or P2 IgG. This could be due to lower sensitivity of the P1/P2 assay, or could relate to the epitope(s) recognized in the commercial Hsp60 assay. Some authors suggested that the intensity of anti-Hsp60 IgG production was correlated with the density of *H. pylori* colonization (44–46). Chronic *H. pylori* colonization of gastric mucosa in CHD patients, even asymptomatic ones, may indirectly intensify the inflammatory response triggered by classic atherogenic agents and deliver crossreacting P1 peptide, which promotes the production of anti-Hsp IgG. *Helicobacter pylori* HspB induces the production of proinflammatory IL-8, both by gastric epithelial cells and monocytic cells through the Toll-like receptor (47). *Helicobacter pylori* LPS, which has poor endotoxic properties, may play an adjuvant role in the development of anti-Hsp60 antibody response (48). During *H. pylori* infection and the atherogenesis process alone, endogenous adjuvants are released, including Hsp, high mobility group box (HMGB1) and uric acid, which are referred to as danger-associated molecular patterns (DAMPs) (49). Cells dying by apoptosis due to *H. pylori* infection (50) can continue delivering a large amount of uric acid, which as monosodium urate crystals is able to sensitize the immune system and to stimulate the maturation of dendritic cells, production of cytokines and differentiation of T lymphocytes (51, 52).

The role of *H. pylori* infection and P1 epitope of *H. pylori* HspB in the initiation of anti-P1 antibody production was confirmed by the adsorption assay of human sera and the sera of guinea pigs experimentally infected with *H. pylori*. In another study by Nakagawa et al., removed the elevated levels of anti-Hsp60 antibodies in *H. pylori* infected vs uninfected *Mongolian gerbils*, were showed (53).

The TTT**ATVLA**RS was found to play a role of a cross-reacting epitope in *H. pylori* HspB and human Hsp60, and was able to stimulate THP-1XBlue™ monocytes to produce TNF-α, IL-1, IL-2 and IL-12, which may suggest the immunomodulatory and proinflammatory potential of P1. However, the role of anti-P1 IgG in the pathogenesis of gastritis and CHD is unkown. These antibodies might diminish gastric colonization with *H. pylori* or upregulate the inflammatory processes due to the deposition of antigen-antibody immune complexes and complement dependent cytotoxicity as previously shown for Lewis-anti-Lewis IgG immune complexes (54). The ATVLA domain of *H. pylori* HspB may promote the inflammatory response due to activation of immunocompetent cells. Considering the role of human Hsp60 as an emergency molecule for the immune system, anti-Hsp60 neutralizing antibodies may help to maintain the infection. It would be good to demonstrate a correlation between anti-P1 IgG and specific disease markers, such as degree of gastritis or atherosclerosis, which would strengthen the current results.

This study showed the presence of anti-Hsp60 IgG antibodies in both *H. pylori* uninfected healthy donors, patients with gastritis due to *H. pylori* infection and in CHD patients who were *H. pylori* positive or negative, which may suggest that these antibodies are natural type antibodies. However, the levels of these antibodies were the highest in CHD patients infected with *H. pylori*, which indicates the role of disease processes in the generation of anti-Hsp60 antibodies. Antibodies to a specific epitope of human Hsp60 (P1) with homology to *H. pylori* HspB were raised in patients with gastritis or CHD infected with *H. pylori* but not in uninfected subjects or asymptomatic *H. pylori* carriers. Adsorbing patient sera positive for anti-P1 IgG with *H. pylori* rods reduced reactivity to P1. The role of *H. pylori* infection and local as well as systemic inflammatory response in raising anti-P1 IgG cannot be excluded. Autoantibodies against P1 were also detected in guinea pigs infected with *H. pylori* but not control animals. THP-1XBlue™ monocytes responded to P1 by the production of proinflammatory cytokines. In conclusion, *H. pylori* HspB containing P1 epitope present in human Hsp60 during *H. pylori* infection may induce anti-P1 IgG with pathogenic potential. P1 by itself may enhance the inflammatory response as a result of stimulation of the immune cells to secrete proinflammatory cytokines.

We thank linguist Ms Jolanta Cwynar for providing language correction in accordance with the requirements of the publisher.

FUNDING

This work was supported by the National Center of Science (grant number NCN 2015/17/N/NZ6/0349).

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Authors responsible for concepts and design were M. Chmiela and W. Gonciarz. W. Gonciarz, A. Matusiak, K. Rudnicka, and A. Gajewski contributed to experimental work and data collection. A. Gajewski contributed to statistical analysis. E. Czkwianianc, M. Broncel, T. Rechciński, and M. Chalubinski were responsible for collecting biological material, diagnosis and classification of patients and healthy donors. M. Chmiela, and W. Gonciarz were responsible for the analysis and interpretation of data and writing the manuscript.

ABBREVIATIONS

^{13}C UBT: ^{13}C urea breath test; Blast: Basic Local Alignment Search Tool; BSA: bovine serum albumin; CagA: cytotoxin associated gene A protein; CCUG: Culture Collection University of Gothenburg, Sweden; CHD: coronary heart disease; DAMPs: danger-associated molecular patterns; ELISA: enzyme linked immunosorbent assay; GE: glycine extract; Hap: hemaglutinin/protease; HLO: *Helicobacter*-like organisms; HMGB1: high mobility group box; HRP: horseradish peroxidase; Hsp: heat shock protein; IDA: iron deficiency anemia; IL: interleukin; ITP: immune thrombocytopenic purpura; LPS: lipopolysaccharide; MALT: mucosa associated lymphoid tissue; oxLDL: oxidized low density lipoprotein; P1: synthetic peptide containing the amino acid sequence (TTT**ATVLA**RS) common to human heat shock protein (Hsp)60 and *H. pylori* HspB; P2: the control synthetic sequence (IAKEGFEKIS); PAIgG: platelet-associated immunoglobulin G; SEAP: secretion of embryonic alkaline phosphatase; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; VacA: vacuolating cytotoxin; vs: *versus*.

REFERENCES

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984;1:1273–5.
2. Posselt G, Backert S, Wessler S. The functional interplay of H. pylori factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. Cell Commun Signal 2013;11:77.
3. Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Stączek P. Host patogen interactions in Helicobacter pylori related gastric cancer. World J Gastroenterol 2017;23:1521–40.
4. EL-Hawary MM, El-Hawary AK, Abdel Gawad SS, EL-Baiomy AA. Helicobacter pylori infection might be responsible for the interconnection between type 1 diabetes and autoimmune thyroidis. Diabetol Metab Syndr 2011;3:28.
5. Papagiannakis P, Michalopoulos C, Papalexi F, Dalampoura D, Diamantidis MD. The role of Helicobacter pylori infection in hematological disorders. Eur J Intern Med 2013;24:685–90.
6. Deng B, Li Y, Zhang Y, Bai L, Yang P. H. pylori infection and lung cancer: a review of an emerging hypothesis. Carcinogenesis 2013;34:406–10.
7. Chmiela M, Gajewski A, Rudnicka K. Helicobacter pylori vs coronary heart disease – searching for connections. World J Cardiol 2015;7:187–203.
8. Park JS, Lee SJ, Kim TH, Yeom J, Park ES, Seo JH, et al. Gastric autoantigenic proteins in Helicobacter pylori infection. Yonsei Med J 2013;54:1342–52.
9. Moran AP, Prendergast MM. Molecular mimicry in Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori lipopolysaccharides: contribution of gastrointestinal infections to autoimmunity. J Autoimmunity 2001;16:241–56.
10. Mnich E, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Hinc K, Obuchowski M, Gajewski A, et al. Impact of Helicobacter pylori on the healing process of the gastric barrier. World J Gastroenterol 2016;22:7536–58.
11. Fairwether D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. J Autoimmun 2001;16:175–86.
12. Yee JKC. Are the view of Helicobacter pylori colonized in oral cavity an illusion? Nature Exp Mol Med 2017;49:e397.
13. Chmiela M, Czkwianianc E, Wadstrom T, Rudnicka W. Role of Helicobacter pylori surface structures in bacterial interaction with macrophages. Gut 1997;40:20–4.
14. Paziak-Domańska B, Chmiela M, Jarosinska A, Rudnicka W. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in Helicobacter pylori infections. Cell Immunol 2000;202:136–9.
15. Rudnicka K, Miszczyk E, Matusiak A, Walencka M, Moran AP, Rudnicka W, et al. Helicobacter pylori-driven modulation of NK cell expansion, intracellular cytokine expression and cytotoxic activity. Innate Immun 2015;21:127–39.
16. Mnich E, Gajewski A, Rudnicka K, Gonciarz W, Stawerski P, Hinc K, et al. Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by Helicobacter pylori antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion. Acta Bioch Pol 2015;62:641–50.
17. Negrini R, Savio A, Appelmelk BJ. Autoantibodies to gastric mucosa in Helicobacter pylori infection. Helicobacter 1997;2(Suppl 1):13–6.
18. Malchers K, Weitzenegger T, Buhmann A, Steinhilber W, Sachs G, Schafer KP. Cloning and membrane topology of a P type ATPase from H. pylori. J Biol Chem 1996;271:446–57.
19. Uibo R, Vorobjova T, Metskula K, Kisand K, Wadstrom T, Kivik T. Association of Helicobacter pylori and gastric autoimmunity: a population-based study. FEMS Immunol Med Microbiol 1995;11:65–8.

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

20. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Helicobacter pylori and autoimmune pancreatic: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? J Cell Mol Med 2005;9:741–4.
21. Kansau I, Guillain F, Thiberge JM, Labigne A. Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the Helicobacter pylori GroES homologue (HspA). Mol Microbiol 1996;22:1013–23.
22. Amadei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, et al. Molecular mimicry between Helicobacter pylori antigens and H+, K+ adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. J Exp Med 2003;198:1147–56.
23. Moran AP, Knirel YA, Senchenkova SN, Widmalm G, Hynes SO, Jansson PE. Phenotypic variation in molecular mimcry between Helicobacter pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. J Biol Chem 2002;227:5785–95.
24. Chmiela M, Miszczyk E, Rudnicka K. Structural modifications of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. An idea how to live in peace. World J Gastroenterol 2014;20:9882–97.
25. Chmiela M, Gonciarz W. Molecular mimicry in Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol 2017;23:3964–77.
26. Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, et al. Molecular mimicry by Helicobacter pylori CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. British J Haematol 2004;124:91–6.
27. Franceschi F, Sepulveda AR, Gasbarrini A, Pola P, Silveri NG, Gasbarrini G, et al. Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens. Circulation 2002;106:430–4.
28. Konieczna I, Żarnowiec P, Kwinkowski M, Kolesinska B, Fraczyk J, Kaminski Z, et al. Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. Curr Prot Peptide Sci 2012;13:789–806.
29. George J, Harats D, Ahoenfeld Y. Autoimmunity in atherosclerosis: the role of autoantigens. Clin Rev Allergy Immunol 2000;18:73–86.
30. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almazar G, Wick MC, Wick G. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. Artherioscler Tromb Vasc Biol 2011;31:960–8.
31. Birnie DH, Holme ER, McKay IC, Hood S, McColl KE, Hillis WS. Association between antibodies to heat shock protein and coronary arteriosclerosis: possible mechanism of action of H. pylori and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. Eur Heart J 1998;19:387–94.
32. Pockley AG, de Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostergard J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. J Hypertens 2002;20:1815–20.
33. Chmiela M, Kowalewicz-Kulbat M, Miszczak A, Wisniewska M, Rechcinski T, Kolodziej K, et al. A link between H. pylori and/or Chlamydia spp. infections and atherosclerosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;36:187–92.
34. Bielański W, Konturek SJ. New approach to ^{13}C urea breath test capsule-based modification with low dose of ^{13}C urea in the diagnosis of Helicobacter pylori infection. J Physiol Pharmacol 1996;47:545–53.
35. Rechcinski T, Chmiela M, Małecka-Panas E, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W. Serological indicators of Helicobacter pylori infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. Microbiol Immunol 1997;41:387–93.
36. Walencka M, Gonciarz W, Mnich E, Gajewski A, Stawerski P, Knapik-Dabrowicz A, et al. The microbiological, histological, immunological and molecular determinants of Helicobacter pylori infection in guinea pigs as a convenient animal model to study pathogenicity of these bacteria and the infection dependent immune response of the host. Acta Bioch Pol 2015;62:697–706.
37. Matusiak A, Chalubiński M, Brioncel M, Rechciński T, Rudnicka K, Miszczyk E, et al. Putative consequences of exposure to Helicobacter pylori infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation. Arch Med Sci 2016;12:45–54.
38. Pfister G, Stroh CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, et al. Detection of Hsp60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. J Cell Sci 2005;118:1587–94.
39. Xiao Q, Mandal K, Schett G, Mayr M, Wick G, Oberhollenzer F, et al. Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in follow-up study. Stroke 2005;36:2571–6.
40. Chalubinski M, Wojdan K, Luczak E, Gorzelak P, Borowiec M, Gajewski A, et al. IL-33 and IL-4 impair barier function of human vascular endothelium via different mechanisms. Vasc Pharmacol 2015;73:57–63.
41. Gajewski A, Mnich E, Szymanski K, Hinc K, Obuchowski M, Moran AP, et al. Helicobacter pylori antigens, acetylsalicylic acid, LDL and 7-ketocholesterol – their potential role in destabilizing the gastric epithelial cell barrier. An in vitro model of Kato III cells. Acta Bioch Pol 2016;63:45–152.
42. Benagiano M, D'Elios MM, Amadei A, Azzurri A, van der Zee R, Ciervo A, et al. Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. J Immunol 2005;174:6509–17.
43. Perschinka H, Wellenzohn B, Parson W, van der Zee R, Willeit J, Kiechl S, et al. Identification of atherosclerosis-associated conformational heat shock protein 60 epitopes by phage display and structural alignmen. Atherosclerosis 2005;194:79–87.
44. Portal-Celhay C, Perez-Peres GI. Immune responses to Helicobacter pylori colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin Sci 2006;110:305–14.
45. Lee HJ, Ock CHY, Kim SJ, Hahn KB. Heat shock protein: hard worker or bad offender for gastric diseases. Int J Proteomics 2010;2010:259163.
46. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J 2016;19:14–23.
47. Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, et al. Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces inflammatory response through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

human gastric epithelial cells. Microbiologogy 2004;150:3913–22.
48. Anderl F, Gerhard M. Helicobacter pylori vaccination: is there a path to protection? World J Gastroenterol 2014;20:11939–49.
49. Evans SY, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. Nature 2003;425:516–21.
50. Unger Z, Molnar B, Szaleczky E, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, et al. Effect of Helicobacter pylori infection and eradication on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis. J Physiol 2001;95:355–60.
51. Kono H, Chen CJ, Ontiveros F. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. J Clin Invest 2010;120:1939–49.
52. Rock KL, Lai JJ, Kono H. Innate and adaptive immune responses to cell health. Immunol Rev 2011;243:191–205.
53. Nakagawa S, Osaki T, Fujioka Y, Yamaguchi H, Kamiya S. Long-term infection of Mongolian gerbils with Helicobacter pylori: microbiological, histopathological, and serological analyses. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12:347–53.
54. Grębowska A, Rechciński T, Bąk-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Moran A, Druszczyńska M, et al. Potential role of LPS in the outcome of Helicobacter pylori related diseases. Pol J Microbiol 2006; 55:25–30.

© 2019 APMIS. Published by John Wiley & Sons Ltd

Dyskusja

Choć badania zapoczątkowane przez Warrena i Marshalla w 1983 r., kontynuowane w wielu ośrodkach badawczych, zaowocowały rozwojem wiedzy na temat chorobotwórczości *H. pylori*, to patogeneza tych zakażeń, patofizjologia inicjowanej przez nie reakcji zapalnej oraz rozwój procesów odpornościowych wciąż są słabo poznane. Nie wiadomo dlaczego zakażenia *H. pylori* mają zróżnicowany przebieg, począwszy od zakażeń bezobjawowych poprzez wrzody żołądka lub dwunastnicy, a także raka żołądka. Bezpośrednie oddziaływanie pałeczek *H. pylori* na komórki nabłonka żołądka gospodarza, a także za pośrednictwem komponentów uwalnianych aktywnie lub wskutek rozpadu pałeczek *H. pylori* podczas kolonizacji błony śluzowej żołądka, lub dwunastnicy, inicjuje rozwój patologicznej reakcji zapalnej. Zaburzenie homeostazy na poziomie bariery nabłonkowej żołądka powinno prowadzić do zaalarmowania układu odpornościowego gospodarza celem naprawy powstałych uszkodzeń oraz eliminacji czynnika zakaźnego. Jednakże, podczas zakażenia *H. pylori* reakcja zapalna początkowo ostra, z czasem staje się przewlekła. To może sugerować udział nie tylko czynników patogenu, ale także gospodarza, w utrwaleniu stanu zapalnego. Mechanizmy sygnałowe warunkujące mobilizację układu odpornościowego gospodarza do eliminacji czynnika zakaźnego i regeneracji uszkodzonego nabłonka żołądka nie są dobrze poznane ze względu na trudności w śledzeniu naturalnej historii zakażenia *H. pylori*. Wiedza w tym zakresie wydaje się być kluczowa dla przewidywania i zapobiegania skutkom takich zakażeń. Obejmuje znajomość mechanizmów warunkujących rozwój przewlekłej reakcji zapalnej, miejscowej i uogólnionej, z uwzględnieniem zarówno czynników patogenu jak i gospodarza. Duże możliwości badawcze stwarzają zwierzęce modele doświadczalne, pozwalające na wywołanie zakażenia o przebiegu podobnym do zakażenia u ludzi oraz ocenę jego objawów i skutków. Jednym z najlepszych jest model kawii domowej o czym decydują m.in. zbliżona budowa nabłonka żołądka świnek morskich do nabłonka ludzkiego oraz budowa anatomiczna i fizjologia tego narządu, wytwarzanie homologu ludzkiej IL-8, zespół białek dopełniacza i podatność na rozwój odpowiedzi odpornościowej adaptacyjnej swoistej zarówno humoralnej jak i komórkowej. Nie są naturalnym rezerwuarem pałeczek z rodzaju *Helicobacter (Lee 1999; Sjunesson i wsp. 2003).* Z kolei modele komórkowe *in vitro* pozwalają na poznanie mechanizmów interakcji pałeczek *H. pylori* z komórkami gospodarza. Poznanie złożonych efektó

modelach komórkowych *in vitro* może przyczynić się do opracowania wyznaczników wspomagających wczesne rozpoznanie zakażenia, zapobiegania jego skutkom, a także do opracowania nowych strategii leczenia i immunoprofilaktyki takich zakażeń.

W prezentowanej pracy wykorzystano oba modele doświadczalne, do oceny skutków interakcji zachodzących pomiędzy pałeczkami *H. pylori* a komórkami gospodarza, w zakresie: kolonizacji i dezintegracji bariery nabłonkowej żołądka, rozwoju reakcji zapalnej i odpornościowej.

I. Efekty oddziaływania *H. pylori* na barierę nabłonkową żołądka w badaniach *in vivo* i *in vitro*

1. Charakterystyka modelu eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych [publikacja I, II, IV].

Aby osiągnąć wyznaczone cele opracowano unikatowy model zakażenia *H. pylori* u kawii domowych wraz z wytypowaniem zestawu skutecznych testów umożliwiających potwierdzenie zakażenia i śledzenie jego skutków, po 7 lub 28 dniach od inokulacji. Model ten wykorzystano w pracach eksperymentalnych, których wyniki zostały zamieszczone w publikacjach I, I, III i V, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

U wszystkich zwierząt inokulowanych *H. pylori*, po 7 lub 28 dniach od zakażenia, w badaniu histopatologicznym wykazano obecność w nabłonku żołądka drobnoustrojów *Helicobacter*-podobnych (HLO). *Shomer i wsp.,* a także *Sturegard i wsp*. również wykazali utrzymywanie się *H. pylori* w nabłonku żołądka kawii domowych przez 4 tygodnie *(Sturegard i wsp. 1998; Shomer i wsp. 1998). Miszczyk i wsp.* potwierdzili występowanie HLO w tkance żołądka kawii zakażanych *H. pylori* po takim czasie wraz z towarzyszącym naciekiem zapalnym, w barwieniu wg Giemsy lub z zastosowaniem króliczych przeciwciał anty-*H. pylori* znakowanych izotiocjanianem fluoresceiny *(Miszczyk i wsp. 2014).*

Metody biologii molekularnej znajdują zastosowanie w diagnostyce zakażeń *H. pylori* u ludzi, choć nie należą do badań rutynowych. Najczęściej jest stosowana klasyczna metoda PCR z wykorzystaniem starterów dla podjednostek ureazy *H. pylori* oraz sekwencji kodującej białko CagA. W badaniach własnych prezentowanych w niniejszej pracy opracowano metodę PCR dla sekwencji kodującej podjednostkę *ureC H. pylori* oraz *cagA*. U wszystkich zwierząt inokulowanych *H. pylori* wykryto w tkance żołądka obie sekwencje. Podejmowane są dalsze wysiłki w celu opracowania i wprowadzenia do oceny zakażenia *H. pylori* u kawii domowych ilościowej metody PCR, która pozwoliłaby określić liczbę pałeczek *H. pylori* kolonizujących komórki nabłonkowe żołądka. To umożliwiłoby ocenę korelacji pomiędzy uszkodzeniem bariery nabłonkowej żołądka a nasileniem reakcji zapalnej, w przeliczeniu na liczbę bakterii oraz efektywność eradykacji.

W prezentowanej pracy zakażenie *H. pylori* u zwierząt potwierdzano także w teście ELISA na obecność antygenów *H. pylori* w kale. W sytuacji utrwalonej kolonizacji nabłonka żołądka przez te bakterie ich antygeny są uwalniane do światła tego narządu, a następnie transportowane do jelita i wydalane wraz z kałem. Dodatni wynik testu uzyskano dla wszystkich zwierząt, po 7 i 28 dniach od inokulacji. Oznacza to, że po tym czasie utrwalona kolonizacja nabłonka żołądka zwierząt była powiązana z namnażaniem się tych bakterii, zapewniając odpowiednio wysokie stężenie antygenów *H. pylori* w kale.

W celu potwierdzenia ekspozycji zwierząt na pałeczki *H. pylori*, w surowicy oznaczano występowanie i poziom przeciwciał klasy IgM i IgG anty-*H. pylori*, stosując wcześniej opracowany laboratoryjny test ELISA z wykorzystaniem ekstraktu glicynowego wzorcowego szczepu *H. pylori,* zawierającego kompleks antygenów powierzchniowych tych bakterii. Wykazano podwyższony poziom przeciwciał klasy IgM anty-*H. pylori* u zwierząt po 7 dniach od ostatniej inokulacji oraz wzrost poziomu IgG anty-*H. pylori* w grupie zwierząt po 28 dniach od zakażenia *H. pylori*. Wykrycie u zwierząt zakażonych *H. pylori,* po 7 dniach od inokulacji, tylko surowiczych przeciwciał IgM anty-*H. pylori* stanowi potwierdzenie ostrej fazy zakażenia. Pojawienie się w surowicy zwierząt po 28 dniach od zakażenia *H. pylori* przeciwciał klasy IgG świadczy o utrwaleniu zakażenia i zaangażowaniu w rozwój procesów

odpornościowych zarówno limfocytów B, jak i limfocytów T. U ludzi przeciwciała klasy IgM anty-*H. pylori* mają niewielkie znaczenie diagnostyczne ponieważ ich podwyższony poziom występuje we wczesnej fazie zakażenia i reakcji zapalnej, której u wielu osób pomimo zakażenia nie towarzyszą objawy. Po dłuższym czasie ekspozycji na zakażenie *H. pylori* wzrasta poziom przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori*, co pozostaje w związku z utrwaleniem zakażenia i rozwojem przewlekłej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka *(Rosemary i wsp. 2009).*

Podsumowując, wykazano rozwój zakazenia H. pylori u kawii domowych inokulowanych tymi bakteriami drogą pokarmową, utrzymującą się przez 28 dni od ich podania.

2. Modulacja kolonizacji [publikacja I].

Podczas zakażenia *H. pylori* dochodzi do interakcji tych bakterii z komórkami nabłonka żołądka gospodarza, co skutkuje trwałą kolonizacją, pomimo wielu mechanizmów ochronnych tej bariery. Utrwalenie zakażenia prowadzi do rozwoju zmian patologicznych, prawdopodobnie nie tylko w miejscu bytowania bakterii w tkance żołądka, ale także nasilenia reakcji zapalnej na obwodzie, w związku z uwalnianiem rozpuszczalnych komponentów *H. pylori* i ich oddziaływaniem na komórki immunokompetentne w krążeniu lub w jelicie. Początkowe oddziaływania obejmują wiązanie składników śluzu, głównie MUC5AC. Mucyny są glikolipidami, zawierającymi w swoim składzie determinanty Le, które wiążą się z adhezynami *H. pylori (Cooke i wsp. 2009; Moran i wsp. 2011).* Z danych literaturowych wiadomo, że determinanty Le^b występujące w śluzie pokrywającym żołądek są jednym z głównych receptorów dla białka powierzchniowego BabA *H. pylori (Ilver i wsp. 1998; Van de Bovenkamp i wsp. 2003; Aspholm i wsp. 2006; Shen i wsp. 2006; Naughton i wsp. 2013; Moran i wsp. 2011; Niv i wsp. 2014).* Wykazano, że pałeczki *H. pylori* z delecją genu *babA* słabiej wiązały mucyny niż szczep dziki *(Backstrom i wsp. 2004).* Bakterie te mogą również wchodzić w interakcje z sialowanymi komponentami mucyn, jakimi są sialowane determinanty LeX za pośrednictwem adhezyny SabA *(Bor-Shyang Sheu i wsp. 2006).* Ponieważ zakażenie z czasem ulega utrwaleniu można przypuszczać, że

bakterie te wpływają na wytwarzanie składników śluzu, co mogłoby stanowić ich mechanizm przystosowawczy do utrzymania się w organizmie gospodarza. W prezentowanej pracy oceniano czy żywe pałeczki *H. pylori,* lub ich rozpuszczalne komponenty, nasilają wytwarzanie MUC5AC oraz determinantów LeX i LeY w nabłonku żołądkowym, w powiązaniu z efektywnością kolonizacji. Badania *in vivo* prowadzono na opracowanym modelu eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych. Przeprowadzono także badania *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka tych zwierząt. Wytwarzanie mucyny MUC5AC oraz determinantów LeX lub LeY, oceniono w barwieniu immunohistochemicznym, zarówno w tkance żołądka zwierząt niezakażonych, jak i zakażonych *H. pylori*, po 7 lub 28 dniach od inokulacji. Powyższe wyznaczniki oceniano także w hodowlach komórek nabłonkowych żołądka traktowanych 2 godziny żywymi pałeczkami *H. pylori* lub przez 24 godziny antygenami powierzchniowymi *H. pylori* – EG, białkiem CagA, podjednostką UreA ureazy, LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*, w odniesieniu do komórek niestymulowanych. Wykazano nasilenie wytwarzania MUC5AC przez pierwotne komórki nabłonka żołądka kawii domowej w odpowiedzi na rozpuszczalne komponenty *H. pylori* oraz żywe bakterie. Spośród badanych komponentów, wytwarzanie MUC5AC najsilniej stymulował LPS *H. pylori*, ale nie LPS *E. coli*. Prawdopodobnie jest to związane z budową LPS *H. pylori*, w skład którego wchodzą fukozylowane antygeny oligosacharydowe identyczne z ludzkimi antygenami Le: Le^a, Le^b, sLeX, sLeY, H typu I oraz A lub B układu grupowego krwi AB0. Jak wykazało wielu autorów ekspresja tych determinantów antygenowych zmienia się w nabłonku żołądka podczas odpowiedzi zapalnej towarzyszącej zakażeniu *H. pylori (Simons-Smith i wsp. 1995; Moran i wsp. 1998; Writh i wsp. 1999; Heneghan i wsp., 2000; Monteiro i wsp. 2000). Van den Brink i wsp. (2000)* a później *Park i wsp. (2015)* wykazali znaczenie MUC5AC w kolonizacji błony śluzowej żołądka przez pałeczki *H. pylori (Van den Brink i wsp. 2000; Park i wsp. 2015).* W prezentowanych obecnie badaniach, na modelu *in vitro* pierwotnych komórek nabłonka żołądka kawii domowych, zwiększona produkcja MUC5AC była skorelowana z zwiększoną depozycją determinantów LeX i LeY, w odpowiedzi na żywe pałeczki *H. pylori,* ich LPS lub UreA. Pozostałe rozpuszczalne komponenty *H. pylori* takie jak: EG, CagA lub referencyjny LPS *E. coli,* nasilały depozycję LeX, ale

nie LeY. Biorąc pod uwagę, że zakażenie *H. pylori* ma charakter wyspowy, można przypuszczać, że różne rozpuszczalne komponenty *H. pylori* mogą lokalnie modulować wytwarzanie śluzu żołądkowego zawierającego MUC5AC oraz determinanty LeX/LeY i ich udział w wiązaniu tych bakterii w sposób zależny od koncentracji. Interakcje *H. pylori* z mucynami w procesie kolonizacji zostały również potwierdzone w badaniach innych autorów, które wykonywano na trzech liniach komórkowych hodowanych w systemie dwukomorowym: HT29 (linia nie wytwarzająca mucyny), HT289-MTX (linia macierzysta, wydzielająca mucynę) oraz HT29-MTX-E13 (linia zawierająca adherentną warstwę śluzu) *(Linden i wsp. 2008).* W tych badaniach wykazano, że pałeczki *H. pylori* najsilniej kolonizowały komórki HT29-MTX-E13, podczas gdy komórki HT29 pozbawione mucyny nie były kolonizowana przez te bakterie. *Park i wsp. (2015)* wykazali wiązanie *H. pylori* z mucynami, w tym MUC5AC, izolowanymi z soku żołądkowego oraz z bioptatami tkanek żołądka pobranymi od pacjentów z dyspepsją czynnościową *(Park i wsp. 2015).* Z kolei *Perrais i wsp. (2014)* w badaniach na komórkach raka żołądka KATO III wykazali, że pałeczki *H. pylori* nasilają ekspresję genu *MUC5AC* w komórkach zakażonych mutantem izogenicznym UreB, ale nie dzikim szczepem wytwarzającym ureazę. To pozwala sugerować, że ureaza *H. pylori* może osłabiać wytwarzania MUC5AC w transformowanych komórkach raka żołądka *(Parrais i wsp. 2014).*

W badaniach własnych *in vivo* na modelu kawii domowych wykazano, że w tkance żołądka, po 7 dniach od podania zwierzętom ostatniej dawki bakterii, dominowały determinanty LeX. Nasilenie wytwarzania mucyny i depozycja determinantów LeX w pierwszej fazie infekcji są prawdopodobnie konieczne do wczesnego zasiedlenia przez te bakterie niszy w żołądku. Natomiast już w przewlekłej fazie infekcji przypuszczalnie istotniejsze są interakcje z samymi komórkami nabłonkowymi żołądka a nie z pokrywającą je mucyną. Osłabienie wytwarzania mucyny, która należy do komponentów pierwszej linii obrony gospodarza przed czynnikami zakaźnymi w późniejszej fazie infekcji, może chronić bakterie przed jej przeciwdrobnoustrojowym działaniem umożliwiając utrwalenie zakażenia. *Park i wsp*. *(2015)* wykazali, że u pacjentów z przewlekłym zakażeniem *H. pylori* produkcja MUC5AC była słabsza niż u osób niezakażonych, co może

wskazywać na słuszność powyższej hipotezy *(Park i wsp. 2015).* Również inni badacze w badaniach na modelu szczura wykazali intensywne wiązanie *H. pylori* z mucynami w błonie śluzowej żołądka lub dwunastnicy *(Naughton i wsp. 2013). Nahabi i wsp.* oceniali na modelu mysim tempo wytwarzania mucyny z wykorzystaniem analogu azydowego N-acetyloglukozaminy-GalNac (GalNaz). Badania te prowadzono w kontekście wczesnej kolonizacji (7 dni) lub przewlekłego zakażenia (90 dni) wywołanego zaadoptowanym do myszy szczepem SS1 *(Navabi i wsp. 2013).* Badacze ci wykazali, że zakażenie *H. pylori* u myszy spowolniło wytwarzanie MUC1, ale nie MUC5AC. *Byrd i wsp.* (2000) w badaniach na komórkach KATO III wykazali, że wytwarzanie MUC5AC, w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori*, było stabilne w ciągu 24 godzin hodowli *(Byrd i wsp. 2000).* Natomiast, w prezentowanym w obecnej pracy modelu badawczym kawii domowych, wykazano nasilenie wytwarzania MUC5AC podczas wczesnej fazy zakażenia, w powiązaniu z nasilonym odkładaniem LeX w tkance żołądka oraz osłabioną produkcję tej mucyny wraz z i LeX w przewlekłej fazie zakażenia. To wskazuje, że pałeczki *H. pylori* podczas infekcji mogą modulować proces wytwarzania MUC5AC, co sprzyja efektywnej kolonizacji. We wczesnej fazie zakażenia pałeczki *H. pylori* potrzebują wielu receptorów mucynowych do utrzymania się w środowisku śluzu żołądkowego. Natomiast osłabienie wytwarzania mucyny na późniejszym etapie zakażenia *H. pylori* może ograniczać usuwanie patogenów i promować rozwój infekcji. Przeprowadzone badania z użyciem przeciwciał blokujących anty-MUC5AC i anty-LeX lub anty-LeY, potwierdzają znaczenie powyższych komponentów w adhezji *H. pylori* do komórek nabłonka żołądka kawii domowej. Należy podkreślić, iż ekspresja genów kodujących ważne czynniki wirulencji *H. pylori* takie jak: BabA, SabA, CagA, UreA, a także flagellinę ulega nasileniu w odpowiedzi na wiązanie bakterii z komponentami mucyny *(Skoog i wsp. 2012).* Sugeruje się, że wytwarzanie adhezyn BabA i SabA, które jest ściśle regulowane na tej drodze pozwala tym bakteriom unikać negatywnych skutków odpowiedzi zapalnej *(Magalhaese i wsp. 2010).*

W pracy wykazano, że nie tylko determinanty antygenowe LeX i LeY, występujące w mucynie pośredniczą w wiązaniu *H. pylori* z komórkami nabłonkowymi żołądka kawii ale uczestniczą w tym także determinanty LeX lub LeY

występujące w LPS *H. pylori*. Świadczy o tym osłabienie wiązania do komórek nabłonkowych kawii domowej pałeczek *H. pylori* traktowanych przeciwciałami anty-LeX i/lub anty-LeY. We wcześniejszym badaniu wykazano, że determinanty LeX i LeY *H. pylori* warunkują wiązanie tych bakterii z komórkami fagoocytarnymi i indukują powstawanie przeciwciał anty-LeX lub anty-LeY, które tworzą kompleksy immunologiczne LeX-anty-LeX IgG oraz LeY-anty-LeY IgG. Kompleksy takie mogą nasilać reakcję zapalną podczas zakażenia *H. pylori* na drodze zależnej od aktywacji białek dopełniacza *(Rudnicka i wsp. 2001).*

Podsumowując, mucyna MUC5AC pokrywająca komórki nabłonkowe żołądka i wchodzące w jej skład determinanty LeX i LeY, warunkują kolonizację H. pylori. Wytwarzanie mucyny jest modulowane przez te bakterie i ich rozpuszczalne komponenty w przebiegu zakazenia co może sprzyjać rozwojowi infekcji przewlekłej. Można sugerować, iż modulacja wytwarzania mucyny oraz determinantów LeX/LeY przez pałeczki H. pylori stanowi ważny mechanizm przystosowawczy tych bakterii umożliwiający rozwój i utrwalenie zakażenia oraz przewlekłej reakcji zapalnej, która zaburza homeostazę bariery nabłonkowej żołądka.

3. Kinetyka i charakter reakcji zapalnej towarzyszącej zakażeniu *H. pylori* [publikacja II]

Podczas zakażenia *H. pylori* u ludzi kolonizacja komórek nabłonkowych żołądka skutkuje zaburzeniem integralności bariery nabłonkowej żołądka, co prowadzi do rozwoju reakcji zapalnej związanej z infiltracją komórek immunokompetentnych, w odpowiedzi na sygnałowe cytokiny takie jak: IL-6, Il-8 i potencjalnie także niedawno odkryta IL-33 *(Wróblewski i Peek 2011; Carton i wsp. 2015).* Reakcją organizmu gospodarza na uszkodzenie tkanek jest inicjacja procesów naprawczych, których zadaniem jest przywrócenie w danym środowisku równowagi fizjologicznej. Efektywność tych procesów podczas zakażenia *H. pylori* jest niewystarczająca ponieważ reakcja zapalna inicjowana przez pałeczki *H. pylori* wiąże się z rozwojem procesów patologicznych. W niszy zapalnej, w żołądku, podczas

zakażenia *H. pylori* uwalniane są liczne komponenty tych bakterii, a ich rola w uszkodzeniu bariery nabłonkowej żołądka i indukcji reakcji zapalnej podczas zakażenia *H. pylori* jest słabo poznana. Jednym z celów badawczych była ocena skutków oddziaływania pałeczek *H. pylori* z komórkami nabłonkowymi żołądka na modelu *in vivo* kawii domowych, podatnych na eksperymentalne zakażenie *H. pylori*, w ostrej (7 dni) lub przewlekłej fazie zakażenia (28 dni), a także w modelu *in vitro* pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów tych zwierząt. Pierwotne komórki nabłonkowe żołądka imitowały w doświadczeniach warstwę komórek, które *in vivo* są eksponowane na bezpośrednie działanie pałeczek *H. pylori* i ich komponentów, zwłaszcza we wczesnej fazie zakażenia. Natomiast fibroblasty, które w naturze występują w warstwie podstawnej błony śluzowej żołądka, mogą być eksponowane na działanie rozpuszczalnych komponentów *H. pylori* w późnej fazie zakażenia. Komórki te biorą udział w naprawie tkanek, a także w indukcji procesów odpornościowych poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych i czynników wzrostowych *(Smith i wsp. 1997; Necchi i wsp. 2007; Wang i wsp. 2011).* Podczas zakażenia *H. pylori* u ludzi dystrybucja komórek odpornościowych w tkance żołądka jest słabo poznana, ze względu na nieznany czas trwania zakażenia i jego bezobjawowy charakter (u ok. 80% osób zakażonych). Z uwagi na powyższe, w pracy oceniono komórki immunokompetentne w tkance żołądka u kawii domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori*, we wczesnej (po 7 dniach) oraz później (po 28 dniach) fazie zakażenia. W ocenie histopatologicznej skrawków tkanki żołądka, wybarwionych hematoksyliną i eozyną u wszystkich zwierząt zakażonych wykazano stan zapalny, jednakże o różnym nasileniu w zależności od czasu trwania infekcji. Po 7 dniach od inokulacji, tkanka i gruczoły żołądkowe była prawidłowe, natomiast po 28 dniach od ostatniej inokulacji zwierząt pałeczkami *H. pylori* wykazywały oznaki uszkodzenia. W obu fazach zakażenia w tkance żołądka, wykazano naciek komórek leukocytarnych. Infiltracja granulocytów, oceniana w barwieniu immunohistochemicznym z przeciwciałami anty-LyG6 była widoczna już po 7 dniach od inokulacji i ulegała dalszemu nasileniu po 28 dniach. We wczesnej fazie infekcji, w tkance żołądka identyfikowano pojedyncze granulocyty kwasochłonne. Napływ granulocytów był powiązany ze zmniejszeniem liczby tych komórek na obwodzie *(Głaczyńska 2017),* co wydaje się potwierdzać transmisję tych komórek z obwodu do

niszy zapalnej w żołądku. Po 7 dniach od inokulacji zwierzat *H. pylori* identyfikowano również gromadzące się limfocyty. Po 28 dniach od inokulacji naciek limfocytów był intensywniejszy i zlokalizowany głównie w warstwie podstawnej, z towarzyszącym występowaniem pęcherzyków limfocytarnych, co wskazywało na przewlekły charakter reakcji zapalnej. Wśród limfocytów wyróżniono zarówno limfocyty T CD4+, jak i T CD8+. Po 7 dniach od inokulacji w tkance żołądka dominowały limfocyty T CD4+ natomiast po 28 dniach limfocyty T CD8+, co w swoich badaniach wykazali także *Kronsteiner i wsp. (Kronsteiner i wsp. 2013).* Otrzymane w pracy wyniki wskazują na ekspansję różnych subpopulacji limfocytów T kawii domowych podczas zakażenia *H. pylori*u. Badania przeprowadzone u ludzi z przewlekłym, aktywnym zakażeniem *H. pylori* pozwalają sugerować, że dominacja limfocytów T CD4+ lub T CD8+ może być powiązana z różnymi objawami klinicznymi zakażenia *(Portal-Celhey i wsp. 2006).* We wcześniejszych badaniach, *Miszczyk i wsp. (2014)* wykazali, że limfocyty T CD4+ wyizolowane z krezkowych węzłów chłonnych kawii domowych, w przewlekłej fazie zakażenia *H. pylori* (28 dni po inokulacji), proliferowały intensywniej, niż w fazie wczesnej, w hodowlach *in vitro,* w środowisku ekstraktu glicynowego zawierającego rozpuszczalne antygeny powierzchniowe tych bakterii *(Miszczyk i wsp. 2014).* Ci sami autorzy oceniali *in vivo* w monocytach i limfocytach krezkowych węzłów chłonnych zwierząt niezakażonych lub zakażonych *H. pylori* mRNA: IL-8, IL-1α i IFN-gamma oraz TGF-beta, po indukcji *in vitro* antygenami tych bakterii *(Miszczyk i wsp. 2014).* W monocytach, zarówno zwierząt niezakażonych jak i zakażonych *H. pylori*, wykryto mRNA IL-8, podczas gdy mRNA IL-1α wykazano tylko w monocytach zwierząt kontrolnych. mRNA TGF-beta wykryto zarówno w limfocytach zwierząt niezakażonych jak i inokulowanych *H. pylori*. Natomiast mRNA IFN-gamma wykazano w komórkach obu grup zwierząt, jednak więcej wykazano w limfocytach zwierząt zakażonych niż niezakażonych tymi bakteriami *(Miszczyk i wsp. 2014).*

Uzyskane wyniki oceny przebiegu reakcji zapalnej u kawii domowych zakażonych *H. pylori* pozostają w zgodzie z wynikami badań innych autorów prowadzonych na modelach zwierzęcych. *Sjoredn i wsp.(2001),* wykazali intensywny naciek komórek jednojądrzastych i eozynofilii w błonie śluzowej żołądka kawii

domowych 3 tygodnie po inokulacji *H. pylori (Sjoredn i wsp. 2001).* Z badań *Shomera i wsp. (1991),* wynika że kolonizacja *H. pylori* utrzymuje się u kawii domowych przez około 15 tygodni, a jej wykładnikiem jest zapalenie błony śluzowej żołądka w części przed-odźwiernikowej i objawia się naciekiem komórek wielojądrzastych, z dużą liczbą eozynofilów, a także makrofagów i limfocytów, na skutek chemotaktycznego działania IL-8 *(Shomer i wsp. 1998).* W modelu badawczym zakażenia *H. pylori* u kawii domowych, zastosowanym przez *Sjunessiona i wsp. (2003),* zakażenie utrzymywało się przez 5 miesięcy i było w tym czasie powiązane z przewlekłą reakcją zapalną w strefie odźwiernika *(Sjunession i wsp. 2003).* Natomiast *Sun i wsp. (2003),* na modelu myszoskoczków mongolskich zakażonych *H. pylori* wykazali w tej strefie uszkodzenie bariery nabłonkowej żołądka i silną infiltrację komórek zapalnych *(Sun i wsp. 2003).*

Podsumowując, na modelu zakażenia H. pylori u kawii domowych wykazano, że kolonizacja nabłonka żołądka przez te bakterie skutkuje rozwojem reakcji zapalnej. Reakcja ta we wczesnym etapie zakażenia charakteryzuje się infiltracją nabłonka żołądka przez granulocyty, w tym eozynofile, przy jednoczesnym zmniejszeniu ich liczby na obwodzie, a także limfocyty T CD4+. W późnym etapie zakażenia w tkance żołądka gromadzą się limfocyty T CD8+. Charakterystycznym objawem późnej reakcji zapalnej jest też lokalizacja w nabłonku żołądka pęcherzyków limfocytarnych.

4. Nasilenie stresu oksydacyjnego [publikacja II].

Jednym z istotnych wyznaczników rozwoju patologicznej reakcji zapalnej w tkankach jest nasilenie stresu oksydacyjnego, w związku z aktywacją komórek immunokompetentnych, głównie neutrofilów i makrofagów. Następstwem eskalacji stresu oksydacyjnego, w związku z uwalnianiem przez te komórki reaktywnych form tlenu, może być rozwój zmian patologicznych, będących następstwem uszkodzenia materiału genetycznego, nasilonej nekrozy, apoptozy, autofagi lub nadmiernej aktywności proliferacyjnej *(Ding i wsp., 2007; Calvino-Fernandez i wsp., 2008; Hand*

i wsp., 2011; Yang i wsp., 2011). Takie procesy mogą również zachodzić w tkance żołądka u osób zakażonych *H. pylori,* jakkolwiek ich natura nie jest dobrze poznana.

W niniejszej pracy, w badaniach na modelu kawii domowych oraz modelach komórkowych *in vitro* oceniano wyznaczniki stresu oksydacyjnego, w kontekście zakażenia *H. pylori*, jako możliwej przyczyny uszkodzenia bariery nabłonkowej żołądka. Wykazano, że reakcja zapalna inicjowana w błonie śluzowej żołądka zwierząt inokulowanych *H. pylori* była powiązana z nasileniem stresu oksydacyjnego o czym świadczył zarówno wzrost stężenia MPO, jak i nasilenie peroksydacji lipidów ocenianej na podstawie 4HNE. Wykazano istotny wzrost 4HNE u zwierząt zakażonych *H. pylori,* po 7 i po 28 dniach od inokulacji, choć peroksydacja lipidów była intensywniejsza we wczesnej fazie niż przewlekłej infekcji, co pozostaje w związku z silniejszą infiltracją nabłonka żołądka przez granulocyty w tym czasie. Nie można wykluczyć, iż słabsza peroksydacja lipidów w tkance żołądka zwierząt po 28 dniach od inokulacji, może być wynikiem nie tylko różnicy w populacji komórek zapalnych, ale także wynikiem uruchomienia pewnych mechanizmów obronnych w komórkach gospodarza. U ludzi zakażonych *H. pylori* źródłem ROS są głównie granulocyty, monocyty i makrofagi, ale także same bakterie *(Zhang i wsp., 1997; Drake i wsp., 1998; Nagata i wsp., 1998; Bagchi i wsp., 2002). Nashiro i wsp. (2000),* którzy badali nacieki neutrofilów w tkance żołądka osób zakażonych *H. pylori*, wykazali istotne zmniejszenie liczby tych komórek po eradykacji, co wiązało się ze zmniejszeniem reakcji zapalnej i uszkodzeniem nabłonka *(Noshiro i wsp., 2000).*

Jednym z głównych mediatorów stymulujących infiltrację granulocytów uwalniających ROS do niszy skolonizowanej w żołądku przez *H. pylori* jest IL-8 wytwarzana przez komórki nabłonkowe tego narządu. Istotnym bodźcem do wytwarzania IL-8 jest też MMP-9, której źródłem są zarówno komórki immunokompetentne, jak i nabłonkowe gospodarza. Zatem nie można wykluczyć, iż podczas zakażenia *H. pylori* występuje pewnego rodzaju sprzężenie zwrotne między nasileniem stresu oksydacyjnego, zależnego od aktywacji komórek immunokompetentnych a wytwarzaniem MMP-9, która nasila wytwarzanie czynnika IL-8 o działaniu chemotaktycznym wobec neutrofilów i innych komórek immunokompetentnych. *Florence i wsp. (2017),* wykazali, że MMP-9 jest także

czynnikiem proapoptotycznym. Można zatem sugerować, iż na tej drodze, może być zaangażowana w regulację procesu zapalnego podczas zakażenia *H. pylori (Florence i wsp. 2017).* W badaniach wstępnych (dane niepublikowane), wykazano podwyższone stężenie MMP-9 w surowicy dorosłych pacjentów z zapaleniem błony śluzowej żołądka lub chorobą wieńcową zakażonych *H. pylori*, w porównaniu do osób zdrowych, u których takie zakażenie wykluczono. W obecnie prezentowanych badaniach, stężenie MMP-9 oceniano zarówno w homogenatach tkanki żołądka oraz w surowicy kawii domowych zakażonych lub niezakażonych *H. pylori.* Stężenie MMP-9 było znacznie wyższe w tkance zwierząt po 7 dniach od podania ostatniej dawki bakterii, niż u zwierząt niezakażonych. Dalszy wzrost stężenia MMP-9 odnotowano u zwierząt zakażonych *H. pylori,* po 28 dniach od inokulacji. Można to powiązać z rozwojem najpierw lokalnej, a następnie obwodowej reakcji zapalnej.

Rola MMP-9 podczas zakażenia *H. pylori* jest prawdopodobnie złożona. MMP-9 katalizuje degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), przez co odgrywa ważną rolę w procesach naprawczych. U ludzi, podczas zakażenia *H. pylori,* dochodzi do przerwania integralności bariery nabłonkowej żołądka. Można sądzić, że jest to wynik bezpośredniego działania pałeczek *H. pylori* lub ich komponentów na nabłonek, w powiązaniu z nadmiernym stresem oksydacyjnym, podczas którego reaktywne formy tlenu doprowadzają do uszkodzenia DNA, co skutkuje nasileniem apoptozy *(Clement i wsp., 1999).*

Podsumowując, w badaniach na modelu eksperymentalnego zakażenia H. pylori u kawii domowych oraz modelach komórkowych, pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka oraz fibroblastów tych zwierząt wykazano, że zakażenie H. pylori wiąże się z nasileniem stresu oksydacyjnego na poziomie bariery nabłonkowej żołądka, o czym świadczą podwyższone wartości jego wyznaczników: MPO, 4HNE oraz MMP-9.

Biorąc pod uwagę rozwój reakcji zapalnej w nabłonku żołądka kawii domowych zakażonych *H. pylori*, w powiązaniu z nasileniem stresu oksydacyjnego, w pracy podjęto badania, których celem była ocena czy w takich okolicznościach u zwierząt zakażonych *H. pylori* dochodzi do zaburzenia integralności bariery

nabłonkowej żołądka na drodze zależnej od apoptozy. Wiadomo bowiem, że reaktywne formy tlenu ten proces indukują.

5. Apoptoza jako potencjalna przyczyna zaburzenia integralności bariery nabłonkowej żołądka [publikacja II].

W teście TUNEL wykazano wzrost liczby komórek ulegających apoptozie w błonie śluzowej żołądka kawii domowych zakażonych eksperymentalnie *H. pylori*, w porównaniu do zwierząt niezakażonych. Więcej apoptotycznych komórek wykryto w tkance żołądka zwierząt zakażonych po 7 niż po 28 dniach od podania ostatniej dawki bakterii, co było zbieżne z wyższym poziomem pro-apoptotycznej kaspazy 3 w ostrej fazie zakażenia (7 dni od inokulacji), niż w fazie przewlekłej (28 dni po inokulacji) i jednocześnie zwiększoną ilością anty-apoptotycznego białka Bcl-xL w tkance żołądka, w tej fazie zakażenia. Nasilenie zmian apoptotycznych w tkance żołądka zwierząt inokulowanych *H. pylori* może być odpowiedzią na reakcję zapalną, szczególnie podczas ostrej fazy infekcji, w celu ochrony nabłonka żołądka przed niekorzystnymi skutkami odpowiedzi zapalnej. Programowana śmierć komórkowa przyczynia się do usunięcia z organizmu komórek uszkodzonych, np. wskutek infekcji lub zmienionych nowotworowo. Podczas apoptozy, w komórkach mogą być indukowane także pewne rozpuszczalne mediatory stanowiące sygnały dla komórek układu odpornościowego, które mobilizują je do ograniczenia infekcji *(Kono i Rock 2008).* Komórki apoptotyczne mogą również pośrednio indukować makrofagi do wytwarzania mediatorów przeciwzapalnych, takich jak transformacyjny czynnik wzrostu (TGF), a także prostaglandyny E2 lub czynnika aktywującego płytki krwi *(Huynh i wsp. 2002).* Wiele czynników, w tym drobnoustroje i ich komponenty, a także białka sygnałowe indukowane podczas procesu zapalnego mogą regulować proces apoptozy. Wiadomo, że usuwanie komórek apoptotycznych przez makrofagi ogranicza reakcję zapalną, jednak pałeczki *H. pylori* osłabiają aktywność fagocytarną zarówno neutrofilów jak i makrofagów, co w konsekwencji może skutkować nieefektywnym usuwaniem nie tylko pałeczek *H. pylori* ale także komórek apoptotycznych i w konsekwencji rozwojem przewlekłej reakcji zapalnej (*Hodge*

i wsp., 2003; Allen i wsp. 2007; Grebowska i wsp., 2008; Du i wsp., 2016). Bimczok i wsp. (2013), wykazali, że komórki nabłonkowe żołądka ulegające apoptozie po ekspozycji na żywe pałeczki *H. pylori* nie były eliminowane przez jednojądrzaste fagocyty zlokalizowane w tkance żołądka, pomimo, że uległy aktywacji o czym świadczyło wydzielanie TNF-α *(Biczmok i wsp. 2013). Shibata i wsp. (1999),* wykazali, że TNF-α, który jest uwalniany przez komórki immunokompetentne pacjentów zakażonych *H. pylori*, może sprzyjać apoptozie komórek nabłonkowych żołądka. Z drugiej jednak strony, takie komórki u osób zakażonych uwalniają więcej rozpuszczalnych receptorów TNF (sTNF-R), niż komórki osób niezakażonych, co może stanowić ochronę przed apoptozą zależną od TNF-α *(Shibata i wsp., 1999).*

W obecnie prezentowanych badaniach wykazano, że błona śluzowa żołądka zwierząt zakażonych *H. pylori* była infiltrowana przez limfocyty. Pozwala to rozważać ich udział w indukcji apoptozy komórek nabłonkowych, co sugerują także inni autorzy (*Stomberg i wsp., 2003; Perfetto i wsp., 2004).* Według *Pierzchalskiego i wsp. (2009),* tylko żywe pałeczki *H. pylori* są zdolne do indukowania apoptozy komórek nabłonkowych żołądka *(Pierzchalski i wsp., 2009).* W obecnych badaniach z wykorzystaniem testu TUNEL, wykazano zwiększoną liczbę pierwotnych komórek nabłonka żołądka kawii domowych i fibroblastów ulegających apoptozie, w odpowiedzi na rozpuszczalne komponenty *H. pylori*: EG, CagA, UreA, LPS lub wzorcowy LPS *E.coli*. *Cho i wsp. (2003),* wykazali także nasilenie ekspresji genów apoptozy, w ludzkich komórkach raka żołądka, w odpowiedzi na toksynę VacA *H. pylori (Cho i wsp. 2003).* We wcześniejszych badaniach wykazano zahamowanie proliferacji ludzkich limfocytów krwi obwodowej dawców w środowisku kompleksu antygenowego szczepu dzikiego *H. pylori* G27 CagA(+) VacA(+) lub mutanta CagA(-)VacA(+) ale nie CagA(-)VacA(-) *(Paziak-Domańska i wsp., 2000).* W obecnych badaniach do stymulacji komórek stosowano EG wzorcowego szczepu *H. pylori* CCUG 178974. Zatem, toksyna VacA występująca w EG mogła być współodpowiedzialna za wywołanie apoptozy komórek.

W hodowlach komórkowych traktowanych LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* apoptoza była nieodwracalna, na co wskazywała kondensacja chromatyny i rozpad jąder komórkowych wykazane w barwieniu DAPI. Aby potwierdzić rolę

komponentów *H. pylori* w nasilaniu apoptozy obu typów komórek, oznaczono wytwarzanie przez komórki pro-apoptotycznych białek, kaspazy 3 (CC3) oraz białka Bax, a także anty-apoptotycznych białek Bcl-xL oraz Bcl-2. Wykazano zmniejszenie ilości anty-apoptotycznego białka Bcl-xL a nasilenie wytwarzania pro-apoptotycznej kaspazy CC3 w komórkach traktowanych komponentami *H. pylori*, w porównaniu do komórek nietraktowanych. *Li i wsp. (2012),* zauważyli, że LPS *H. pylori* nasilał wydzielanie przez komórki nabłonkowe żołądka pro-apototycznej MMP-9 na drodze zależnej od ścieżki sygnałowej TLR-4/NF-kappa B *(Li i wsp., 2012).* Również w obecnych badaniach pierwotne komórki nabłonkowe żołądka kawii oraz ich fibroblasty stymulowane LPS *H. pylori* uwalniały do środowiska hodowlanego MMP-9. Wykazano, że dodatek do środowiska hodowlanego egzogennej MMP-9 spowodował nasilenie apoptozy indukowanej komponentami *H. pylori*, co wskazywało na synergistyczne działanie obu tych czynników.

Wzrost liczby komórek tworzących barierę nabłonkową żołądka, które ulegają apoptozie podczas zakażenia *H. pylori,* może sprzyjać ograniczeniu infekcji oraz eliminacji nieprawidłowych komórek. Ma to szczególne znaczenie ponieważ pałeczki *H. pylori* zostały zaliczone do karcinogenów I klasy. Z drugiej jednak strony nasilenie apoptozy może skutkować zwiększeniem przepuszczalności bariery nabłonkowej żołądka i opóźnieniem procesów regeneracyjnych, zwłaszcza jeśli eliminacja komórek apoptotycznych przez fagocyty jest niewystarczająca, co może mieć miejsce w związku z osłabieniem ich właściwości żernych w środowisku komponentów *H. pylori* (*Chmiela i wsp., 1997; Ramaro i Meyer., 2001; Grębowska i wsp., 2008; Viladomiu i wsp., 2017).* Pozostające w tkance komórki apoptotyczne mogą ulegać z czasem nekrozie, sprzyjając rozwojowi przewlekłej reakcji zapalnej. Utrata integralności bariery nabłonkowej żołądka wskutek nasilenia apoptozy może potencjalnie umożliwiać transmisję komponentów *H. pylori* do głębszych warstw nabłonka oraz krążenia. Taką sugestię wydają się potwierdzać badania *Gajewskiego i wsp. (2018),* w których wykazano wzrost przepuszczalności monowarstwy ludzkich komórek nabłonkowych żołądka, a także śródbłonka naczyniowego w hodowlach *in vitro,* w odpowiedzi na rozpuszczalne komponenty *H. pylori* m.in. LPS, w powiązaniu z nasileniem apoptozy *(Gajewski i wsp., 2018).*

Podsumowując, wyniki badań na modelu in vivo kawii domowych doświadczalnie zakażonych H. pylori oraz modelach komórkowych in vitro pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka oraz fibroblastów tych zwierząt wskazują, że zarówno pałeczki H. pylori, jak i ich rozpuszczalne komponenty indukują apoptozę obu typów komórek. Proces ten jest nasilany w środowisku MMP-9, której źródłem in vivo są komórki gospodarza eksponowane na komponenty tych bakterii.

6. Ograniczenie efektywności procesów regeneracji bariery nabłonkowej żołądka w środowisku pałeczek *H. pylori* i ich komponentów [publikacja II].

Zakażeniu *H. pylori* towarzyszy zaburzenie integralności bariery nabłonkowej żołądka, co może być spowodowane jej uszkodzeniem wskutek bezpośredniego oddziaływania pałeczek *H. pylori* i ich komponentów, zmniejszeniem wytwarzania przez komórki białek adhezyjnych i białek ścisłych połączeń, lub nasileniem reakcji zapalnej gospodarza *(Nursat i wsp., 2000).* W badaniach własnych wykazano, że istotną rolę odgrywa stres oksydacyjny i eliminacja komórek na drodze apoptozy. W sytuacji zaburzenia homeostazy, komórki tworzące tę barierę mobilizują się do przywrócenia równowagi m.in. migrację i proliferację, co pozwala na uzupełnienie niedoborów komórkowych. *De Paulis i wsp. (2009),* wykazali, że efektem interakcji peptydu RpL1aa 2-20 *H. pylori* z receptorami peptydu formylowego (FPR) komórek nabłonkowych żołądka jest indukcja migracji i proliferacji komórek, a także ekspresja genu kodującego naczyniowy czynnik wzrostowy (VEGF), o działaniu pro-regeneracyjnym *(de Paulis i wsp. 2009).* W prezentowanej pracy, w badaniach *in vivo* u kawii domowych, niezakażonych lub zakażonych *H. pylori*, oceniano liczbę proliferujących komórek nabłonkowych, w barwieniu immunohistochemicznym, umożliwiającym identyfikację komórek z ekspozycją powierzchniową białka Ki-67, które jest wyznacznikiem komórek w fazie podziału. Również na modelach komórkowych *in vitro* oceniano czy nasilenie stresu oksydacyjnego i wzrost liczby komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów kawii domowej ulegających

apoptozie są powiązane ze zdolnością migracji i proliferacji tych komórek. Wykazano, że komórki nabłonkowe żołądka zwierząt zakażonych *H. pylori* proliferowały intensywniej w przewlekłej niż w ostrej fazie infekcji. Jest to zjawisko korzystne w kontekście regeneracji uszkodzonej tkanki jakkolwiek wzrost aktywności proliferacyjnej komórek nabłonkowych żołądka podczas zakażenia *H. pylori* może zwiększać ryzyko powstawania zmian nowotworowych *(Rudnicka i wsp., 2019).* Wykazano, że komórki nabłonkowe żołądka osób zakażonych *H. pylori*, zwłaszcza szczepami wytwarzającymi karcinogenne białko CagA, znajdują się w stanie hiperproliferacji, co wykazano w badaniach z wykorzystaniem świeżych skrawków tkankowych traktowanych bromodeoxyurydyną, a następnie przeciwciałami o takiej swoistości znakowanymi enzymatycznie *(Chmiela i wsp. 1998).* W obecnie prowadzonych badaniach oceniano zdolność migracji pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka kawii domowych lub fibroblastów w tzw. „teście gojenia rany". Wykazano zdolność komórek traktowanych komponentami *H. pylori* EG, CagA lub UreA, do zasklepiania uszkodzenia w monowarstwie komórek. Ta zdolność tylko w przypadku komórek traktowanych kompleksem EG była powiązana z nasileniem aktywności proliferacyjnej komórek. Dane te pozwalają sadzić, iż w odpowiedzi na powyższe komponenty *H. pylori*, w szczególności EG, komórki tworzące barierę nabłonkową wykazywały potencjał pro-regeneracyjny. O ile taki efekt występował w środowisku EG, CagA lub UreA, to w środowisku LPS *H. pylori*, podobnie jak i wzorcowego LPS *E. coli*, komórki nie migrowały i nie proliferowały, co wskazuje na zaburzenie procesu regeneracji uszkodzonej bariery nabłonkowej żołąda. Z badań innych autorów wynika, że LPS *H. pylori* nasila wydzielanie przez komórki nabłonkowe żołądka cytokin prozapalnych obniżając jednocześnie zdolność takich komórek, a także komórek immunokompetentnych, do wydzielania cytokin regulatorowych. Hamuje również cykl komórkowy *(Slomiany i wsp., 1999; Lai i wsp., 2003; Mnich i wsp., 2016).* Znamienne są także wyniki badań wskazujące na hamowanie przez LPS *H. pylori* aktywności żernej fagocytów oraz cytotoksycznej komórek NK, a także ekspansji limfocytów *(Chmiela i wsp., 1997; Grebowska i wsp., 2008, Paziak-Domańska i wsp., 2000; Rudnicka i wsp, 2011, 2012, 2015, Mnich i wsp., 2016).* To pozwala sądzić, iż podczas zakażenia *H. pylori* LPS tych bakterii może nie tylko współuczestniczyć w uszkodzeniu bariery nabłonkowej żołądka i zaburzeniu

procesów regeneracyjnych ale także ograniczać skuteczność mechanizmów odpornościowych gospodarza.

W obecnych badaniach własnych poszukiwano odpowiedzi na pytanie jakie mechanizmy są uruchamiane w komórkach nabłonkowych żołądka gospodarza celem przywrócenia ciągłości tej bariery. Wzięto pod uwagę wytwarzanie IL-33, zaliczanej do cytokin alarmowych, której stężenie wzrasta w błonie śluzowej żołądka pacjentów podczas ostrej fazy zakażenia *H. pylori (Buzelli i wsp., 2015).* W badaniach *in vivo* na modelu kawii domowych wykazano znaczny wzrost stężenia IL-33 w komórkach nabłonkowych żołądka i homogenatach tkanki żołądka zwierząt zakażonych, po 7 i 28 dniach od inokulacji, w porównaniu do zwierząt niezakażonych. W badaniach *in vitro* na pierwotnych komórkach nabłonkowych żołądka kawii oraz fibroblastach nietransfekowanych lub transferowanych siRNA IL-33, oceniano zdolność komórek do spontanicznej i indukowanej *H. pylori* migracji oraz proliferacji. Wykazano, że tylko komórki nietransfekowane, wytwarzające IL-33, były zdolne do migracji w teście gojenia rany oraz do proliferacji ocenianej w teście redukcji MTT, co pozwala sugerować, iż cytokina ta może mieć działanie pro-regeneracyjne. Ponadto wykazano, że komórki z zachowaną zdolnością wytwarzania IL-33, traktowane EG *H. pylori,* lepiej migrowały i proliferowały niż komórki hodowane w samym podłożu, co było powiązane z nasileniem wytwarzania IL-33 w środowisku EG, identyfikowanej zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i w supernatantach pohodowlanych. *Millar i wsp. (2017)* wykazali, że do zainicjowania gojenia tkanek niezbędne jest wiązanie IL-33 z receptorem wydzielniczym (ST2) tej cytokiny *(Millar i wsp. 2017).* W modelu komórek naskórka wykazano, że IL-33 może być zaangażowana w regenerację tkanek także za pośrednictwem limfocytów ILC2 dostarczających amfireguliny, która determinuje przeżycie i proliferacje komórek *(Lott i wsp., 2015).* W innych badaniach wykazano także, że IL-33 nasilała proliferację i inwazyjność komórek zrębu na szlaku zależnym od chemokin CCL2, o czym świadczyło nasilenie fosforylacji czynnika transkrypcyjnego NF-kappa B i kinazy Erk *(Hu i wsp., 2014).* Również z badań własnych wynika, że IL-33 może kontrolować aktywację Erk w komórkach nabłonkowych żołądka i fibroblastach kawii domowych, zwłaszcza w środowisku EG *H. pylori*. Poziom fosforylowanej kinazy Erk był bowiem wyższy w komórkach

transferowanych siRNA IL-33 niż nie transferowanych traktowanych EG. Rola IL-33 w procesach regeneracji tkanek może być związana z hamowaniem procesu apoptozy. *Seki i wsp (2009).,* wykazali zarówno w badaniach *in vivo* jak i *in vitro,* że IL-33 poprzez sygnalizację za pośrednictwem receptora ST2, zapobiega indukowanej niedotlenieniem apoptozie kardiomiocytów, co poprawia czynność serca oraz przeżycie pacjentów po zawale *(Seki i wsp., 2009*). Jakkolwiek, cytokina ta jest wrażliwa na degradację przez kaspazy efektorowe apoptozy (kaspaza 3 i 7) *(Oboki i wsp., 2010, 2010a).* Wyniki badań własnych pozwalają sugerować, iż IL-33 hamuje apoptozę i promuje migrację oraz proliferację komórek. Około 20% pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów kawii domowej w 24 godzinnych hodowlach, w samym podłożu hodowlanym, wykazywało cechy komórek apoptotycznych, a w hodowlach z EG *H. pylori* około 40% komórek. W hodowlach komórek transferowanych siRNA IL-33, w samym podłożu hodowlanym, odnotowano 40% komórek apoptotycznych obu typów, a w środowisku EG *H. pylori*, odpowiednio 60% komórek nabłonkowych i 70% fibroblastów. Wyniki te pozwalają sugerować przeciw-apoptotyczne działanie IL-33. *Oboki i wsp. (2010a),* w badaniach na modelu myszy *IL-33 -/- lub IL-33 +/+* z zapaleniem jelita grubego wywołanym siarczanem sodu wykazali, że niedobór IL-33 skutkował opóźnieniem procesów naprawczych w jelicie *(Oboki i wsp., 2010a).* Według tych autorów komórki ulegające apoptozie w środowisku zapalnym mogą sprzyjać kontroli nadmiernej aktywności prozapalnej IL-33 za pośrednictwem kaspazy-3, która, tę cytokinę degraduje *(Oboki i wsp., 2010a).* Uzyskane wyniki badań własnych pozwalają sugerować, iż w odpowiedzi na nuszkodzenie bariery nabłonkowej żołądka wywołane przez pałeczki *H. pylori* i ich komponenty, co pozostaje w związku z nasileniem stresu oksydacyjnego i apoptozy, komórki gospodarza wytwarzają IL-33, która może odgrywać korzystną rolę w procesie regeneracji tej bariery. Prawdopodobnie mechanizm ten może polegać na hamowaniu apoptozy i promowaniu migracji i proliferacji komórek. Jednakże działanie anty-apoptotyczne IL-33 w tkance żołądka osób zakażonych *H. pylori,* zwłaszcza szczepami wytwarzającymi białko CagA, może sprzyjać rozwojowi zmian nowotworowych *(IRAC 1994).* Jak sugerują *Krzysiek-Maczka i wsp. (2013), H. pylori* indukuje różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty, co wiąże się z pojawieniem się wczesnych markerów nowotworowych, takich jak czynnik indukowany hipoksją

(HIF)-α, i zmniejszeniem wytwarzania pro-apoptotycznego białka Bax *(Krzysiek-Maczka i wsp., 2013).*

Podsumowując, na modelu in vivo kawii domowych doświadczalnie zakażonych H. pylori oraz modelach komórkowych in vitro pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów tych zwierząt wykazano, że wraz z nasilającym się stresem oksydacyjnym towarzyszącym zakażeniu wzrasta odsetek komórek ulegających apoptozie. Proces ten może sprzyjać ograniczeniu reakcji zapalnej i chronić przez rozwojem zmian nowotworowych. Jednakże utrata komórek na tej drodze może zmniejszać integralność oraz funkcje ochronne bariery nabłonkowej żołądka i przyczyniać się do utrwalenia reakcji zapalnej. W odpowiedzi na zaburzenie integralności bariery nabłonkowej podczas zakażenia H. pylori, inicjowane są procesy naprawcze, w których pośredniczy IL-33, poprzez stymulację migracji oraz proliferacji komórek nabłonkowych, w powiązaniu z hamowaniem apoptozy.

II. Ogólnoustrojowe skutki zakażenia *H. pylori* [publikacja III, IV].

1. Mimikra antygenowa i jej znaczenie w patogenezie zakażeń *H. pylori* [publikacja VI].

Typowym objawem zakażenia *H. pylori* jest reakcja zapalna w nabłonku żołądka, związana z napływem komórek odpornościowych: granulocytów, makrofagów i limfocytów. Aktywacja tych komórek sprzyja nasileniu zmian patologicznych w nabłonku żołądka m.in. poprzez nasilenie stresu oksydacyjnego oraz apoptozy, w powiązaniu z zaburzeniem integralności bariery nabłonkowej i procesów regeneracyjnych. Podczas reakcji zapalnej komponenty *H. pylori* inicjują rozwój procesów odpornościowych, w tym wytwarzanie przeciwciał. Niektóre komponenty *H. pylori* są podobne antygenowo do komponentów gospodarza, stąd indukowane przeciwciała potencjalnie mogą mieć charakter autoreaktywny. Takie podobieństwo znane jako - „mimikra molekularna lub antygenowa" jest powszechną strategią wykorzystywaną przez czynniki zakaźne do unikania eliminacji przez efektorowe mechanizmy odpornościowe gospodarza. Podobieństwo antygenowe może mieć charakter sekwencyjny lub przestrzenny *(Oldstone 1989; Quaratino i wsp. 1995; Sfriso i wsp. 2010).* Późną konsekwencją zakażeń wywoływanych przez *Streptococcus pyogenes,* na tle mimikry antygenowej pomiędzy paciorkowcowym białkiem M a komponentami gospodarza, może być tzw. gorączka reumatyczna, zapalenie mięśnia sercowego lub kłębuszków nerkowych *(Whitton i Feuer 2004; Sfriso i wsp. 2010).* Z kolei *Klebsiella pneumoniae* stymuluje wytwarzanie przeciwciał wiążących ludzki antygen zgodności tkankowej (HLA)-B27 a *Campylobacter pylori* indukuje przeciwciała przeciw-gangliozydowe, co skutkuje powikłaniami neurologicznymi *(Sfriso i wsp. 2010; Shahrizaila i Yuki 2011).* Również liczne wirusy m.in. wirus Epsteina-Barra, a także wirus zapalenia wątroby typu B, mają sekwencje wspólne z komórkami nerwowymi *(Fujinami i Oldstone 1985; Wandinger 2000).*

Hipoteza indukcji przeciwciał auto-reaktywnych przez pałeczki *H. pylori* została po raz pierwszy zasugerowana na podstawie badań, w których wykazano występowanie w surowicach niektórych pacjentów zakażonych *H. pylori* przeciwciał reagujących z komórkami nabłonkowymi żołądka zlokalizowanych w części

odźwiernikowej *(Negrini i wsp. 1996; 1997; D'Elios i wsp. 2004).* Podejrzewa się udział zakażenia *H. pylori* w rozwoju zanikowego zapalenia nabłonka żołądka *(Schwartz 1960; Taylor i wsp. 1962; Strickland i Mackay 1973),* trombocytopenii *(Gasbarrini i wsp. 1998),* autoimmunologicznego zapalenia trzustki *(Polyzos i wsp. 2011),* ChNS *(Rožanković i wsp. 2011, Matusiak i wsp. 2016)* a także zaburzeniach wzrostu u dzieci *(Fetissov i wsp. 2008).* Prawdopodobnie przeciwciała anty-CagA odgrywają rolę w trombocytopenii, w związku z podobieństwem tego białka *H. pylori* do glikoprotein płytek krwi: GP I i GP II, a także w rozwoju anemii z niedoboru żelaza *(Gasbarrini i wsp. 1998; Takahashi i wsp. 2003; Stasi i Provan 2008; Cheng i wsp. 2015).* W autoimmunologicznym zapaleniu błony śluzowej żołądka, na tle zakażenia *H. pylori,* powiązanym z atrofią i zmniejszeniem wydzielania kwasu solnego przez komórki okładzinowe, autoantygenem jest H+/K+-ATPaza *(Schwartz 1960; Taylor i wsp. 1962; Strickland i wsp. 1973).* Antygeny Lewis występujące na komórkach nabłonkowych żołądka, w śródbłonku naczyniowym a także na powierzchni granulocytów, i erytrocytów po związaniu z przeciwciałami anty-Lewis indukowanymi przez determinanty Lewis występujące w LPS *H. pylori,* mogą aktywować dopełniacz i poprzez lizę komórek nasilać reakcję zapalną. Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych indukowanych przez immunizację myszy *H. pylori* wykazały wiązanie takich przeciwciał z ludzkimi komórkami nabłonkowymi żołądka, komponentami mucyny, granulocytami a także H+/K+-ATPazą *(Boren i wsp. 1993). Chmiela i wsp. (1999),* wykazali, że przeciwciała anty-Lewis, zwłaszcza klasy IgM, występują nie tylko u pacjentów zakażonych *H. pylori* ale także u osób zdrowych, co sugeruje, iż mogą to być przeciwciała inicjowane przez inne niż *H. pylori* czynniki zakaźne, lub będące następstwem tzw. naturalnej autoimmunizacji *(Chmiela i wsp. 1999).* Jednakże częstość wytwarzania i poziom przeciwciał anty-Lewis jak wykazano w tych badaniach były wyższe u pacjentów z objawami dyspepsji oraz pacjentów z ChNS, zakażonych niż niezakażonych *H. pylori*. Zakażeniu *H. pylori* towarzyszył także wyższy poziom kompleksów immunologicznych LeX/Y-IgG anty-LeX/Y w surowicy, które potencjalnie mogą ulegać lokalnej depozycji w nabłonku żołądka lub w śródbłonku naczyniowym *(Chmiela i wsp. 1998; 2014; Hirota i wsp. 1995).*

Od 1994 r., ukazało się wiele prac opartych na badaniach serologicznych, wskazujących na związek zakażeń *H. pylori* z rozwojem ChNS *(Danesh i wsp. 1998; Chmiela i wsp. 2015).* Zakażenia szczepami *H. pylori* CagA+ wykrywano znacznie częściej u pacjentów z ChNS, niż u osób bez objawów tej choroby, co może sugerować rolę takich zakażeń w rozwoju miażdżycy *(Pasceri i wsp. 2002). Franceschi i wsp. (2002),* wykazali krzyżowe wiązanie przeciwciał anty-CagA *H. pylori* z ludzkimi białkami o masach 160 i 180 kDa występujących w lizatach tkanek naczyniowych objętych procesem arteriosklerozy *(Franceschi i wsp, 2002).* Wstępne wyniki badań własnych wskazują, że białko CagA *H. pylori* u pacjentów z takim zakażeniem, może być źródłem przeciwciał krzyżowo-reagujących z receptorem TNF typu 1 (TNFR), co potwierdzono u kawii domowych zakażonych *H. pylori (Gonciarz i wsp. 2020).* Inni autorzy sugerują znaczenie w rozwoju ChNS przeciwciał inicjowanych przez region ureazy *H. pylori*, posiadający motyw IKEDV występujący także w strukturze receptora chemokinowego CCRL1 (CC chemokine receptor-like 1), zlokalizowanego w naczyniach wieńcowych *(Arabski i wsp. 2010; Konieczna i wsp. 2012).*

Pałeczki *H. pylori* wytwarzają dwa rodzaje białek Hsp: HspA, będące homologiem ludzkiego białka opiekuńczego GroES lub Hsp 10 oraz HspB podobne do ludzkiego białka opiekuńczego GroEL lub Hsp60 *(Kansau i wsp. 1996, 1997; Ng i wsp. 1999).* Badania *Matusiak i wsp. (2016),* sugerują, że przewlekła ekspozycja na zakażenie *H. pylori* u pacjentów z ChNS sprzyja wytwarzaniu przeciwciał anty-HspB, które krzyżowo reagują z ludzkim białkiem Hsp60. Autorzy ci zakładają, że takie przeciwciała, podobnie jak przeciwciała przeciw-ureazowe mogą nasilać proces zapalny w naczyniach wiążąc się z białkiem Hsp60, którego ekspozycja w śródbłonku naczyniowym nasila się podczas procesu zapalnego *(George i wsp. 2000; Matusiak i wsp. 2016).* Potwierdzenie udziału białka HspB *H. pylori* w indukowaniu u ludzi przeciwciał anty-HspB, potencjalnie auto-rekatywnych, oraz ich roli w rozwoju ChNS, wymaga dalszych badań. Trudność w ich prowadzeniu wynika między innymi z nieznajomości czasu trwania zakażenia, co uniemożliwia ocenę dynamiki powstawania przeciwciał podczas zakażenia.

2. Rola zakażenia *H. pylori* w indukowaniu przeciwciał krzyżowo-reagujących z ludzkim białkiem Hsp60 [publikacja V].

Białka Hsp gospodarza mogą stanowić zarówno bodziec do powstawania przeciwciał autoreaktywnych, jak i struktury docelowe w procesach patologicznych wynikających z autoimmunizacji. Mogą stać się immunogenne wskutek zmian strukturalnych lub po-translacyjnej modyfikacji, w wyniku zaburzeń metabolicznych lub procesów oksydacyjnych. Możliwe jest również tworzenie kompleksów białek Hsp gospodarza z własnymi lub obcymi antygenami, dzięki czemu mogłyby stymulować limfocyty B do wytwarzania przeciwciał rozpoznających własne białka Hsp *(Rabczynski i wsp. 2006).* Inna możliwość udziału białek Hsp gospodarza w procesach patologicznych o podłożu autoimmunizacyjnym może być wynikiem podobieństwa takich białek do białek Hsp czynników zakaźnych. Z uwagi na powyższe, w obecnie prezentowanej pracy wykonano badania, których celem była ocena w surowicach pacjentów z objawami dyspepsji oraz pacjentów z ChNS, zakażonych *H. pylori*, w odniesieniu do osób zdrowych, z wykluczonym zakażeniem tymi bakteriami przeciwciał krzyżowo-reagujących z sekwencją wspólną (TTT**ATVLA**RS) białka HspB *H. pylori* i ludzkiego białka Hsp60. Sekwencja ta została wyznaczona na drodze analizy bioinformatycznej z zastosowaniem algorytmu BLAST. Aby wykazać iż, przeciwciała anty-HspB, potencjalnie auto-reaktywne są inicjowane podczas zakażenia *H. pylori,* posłużono się modelem kawii domowych eksperymentalnie zakażonych tymi bakteriami.

Wykazano, że tylko u pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* poziom przeciwciał wiążących ludzkie białko Hsp60 był istotnie wyższy niż u zakażonych tymi bakteriami pacjentów z objawami dyspepsji lub osób zdrowych, u których zakażenie *H. pylori* wykluczono. Podobnie, przeciwciała anty-P1 skierowane przeciwko peptydowi (P1), zawierającemu sekwencję wspólną HspB *H. pylori* i ludzkiego białka Hsp60, wykryto w surowicach pacjentów z zapaleniem błony śluzowej żołądka oraz u pacjentów z ChNS, zakażonych *H. pylori*. Poziom takich przeciwciał był wyższy w grupie pacjentów z ChNS, podobnie jak stężenie rozpuszczalnego białka Hsp60, co było odnotowane także przez innych autorów

(Grundtman i wsp. 2011). Można przypuszczać, iż u pacjentów z ChNS zarówno klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy takie jak oksydowana frakcja LDL (oxLDL), a także bakteryjny LPS, którego przenikanie się zwiększa, mogą indukować w śródbłonku naczyniowym stres oksydacyjny, skorelowany z nasiloną ekspozycją cząsteczek alarmowych, w tym Hsp60 *(Chałubiński i wsp. 2015; Xiao i wsp. 2016).* W badaniach innych autorów wykazano, że cytokiny prozapalne oraz poziom białka wiążącego lipopolisacharyd (LBP) były podwyższone u pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori*, co wskazywało na mobilizację układu odpornościowego gospodarza, która mogła skutkować indukcją odpowiedzi humoralnej (*El-Hawary i wsp. 2011; Matusiak i wsp. 2016).* Należy również wziąć pod uwagę, iż u pacjentów z ChNS występuje nasilona ogólnoustrojowa reakcja zapalna powiązana często z otyłością lub cukrzycą. Brak przeciwciał IgG anty-P1 w surowicach osób zdrowych, choć seropozytywnych w zakresie przeciwciał anty-*H. pylori*, wydaje się potwierdzać znaczenie lokalnej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka, w promowaniu powstawania przeciwciał IgG anty-P1.

W prezentowanych badaniach, większość osób zdrowych wytwarzała przeciwciała przeciwko pełnej cząsteczce białka Hsp60, ale nie przeciwko sekwencji P1. Może to być wynikiem niższej czułości laboratoryjnego testu ELISA, z użyciem Hsp60 lub P1, ale może również być determinowane strukturą epitopu peptydu P1.

Niektórzy autorzy wskazują na występowanie korelacji pomiędzy intensywnością wytwarzania przeciwciał IgG anty-Hsp60 a nasileniem kolonizacji nabłonka żołądka przez *H. pylori (Portal-Celhay i wsp. 2006; Lee i wsp. 2010; Kao i wsp. 2016).* U pacjentów z ChNS, nawet tych zakażonych bezobjawowo kolonizacja błony śluzowej żołądka przez *H. pylori*, może wzmagać odpowiedź zapalną inicjowaną przez klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy. Środowisko takiej reakcji może sprzyjać uwalnianiu z pałeczek *H. pylori* sekwencji peptydowych promujących wytwarzanie przeciwciał anty-P1.

Samo białko HspB *H. pylori* indukuje wytwarzanie prozapalnej IL-8, zarówno przez komórki nabłonka żołądka, jak i monocyty , za pośrednictwem receptorów TLR *(Takenaka i wsp. 2004).* Przyjmowanie przez pacjentów z ChNS, w celach

terapeutycznych, niskich dawek kwasu acetylosalicylowego może skutkować uszkodzeniem nabłonka żołądka zwiększając ryzyko zakażenia *H. pylori (Gajewski i wsp. 2016; Mnich i wsp. 2016).* Reakcją na uszkodzenie infekcyjne lub w następstwie procesu arteriosklerozy toczącego się w naczyniach jest nasilenie wytwarzania białka Hsp60, które może stać się celem dla przeciwciał indukowanych podczas zakażenia *H. pylori* przez białko HspB tych bakterii. Niektórzy autorzy sugerują, że środowisko zapalne w śródbłonku naczyniowym sprzyja modyfikacji białka Hsp60 do formy immunogennej przez metaloproteinazy *(Perschinka i wsp. 2005; Benagiano i wsp. 2005).* Takie warunki mogą towarzyszyć zakażeniu *H. pylori.* W obecnie prezentowanej pracy wykazano zależność pomiędzy zakażeniem *H. pylori* u kawii domowych a wytwarzaniem MMP-9 **[publikacja II]**.

Krzyżowe wiązanie białka HspB *H. pylori* przez przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiemu białku Hsp60 wykazali *Kawahara i wsp. (1999),* a *Okada i wsp. (2007),* potwierdzili, że przeciwciała klasy IgG przeciwko określonym sekwencjom aminokwasowym białka HspB *H. pylori* rozpoznawały determinanty antygenowe ludzkiego białka Hsp60 *(Kawahara i wsp. 1999; Okada i wsp. 2007).*

Wydaje się, iż LPS *H. pylori*, który wykazuje słabe właściwości jako endotoksyna, może odgrywać istotną rolę jako adiuwant w indukowaniu wytwarzania przeciwciał anty-Hsp60 *(Anderl i Gerhard 2014).* Do uwrażliwiania układu odpornościowego podczas zakażenia *H. pylori* może przyczyniać się też kwas moczowy, którego stężenie wzrasta wskutek uszkodzenia komórek na drodze apoptozy *(Ewans i Rock 2003).* Jednosodowe kryształy moczanu mogą stymulować dojrzewanie komórek dendrytycznych, różnicowanie limfocytów T, a także wytwarzanie cytokin *(Rock i wsp. 2011).* W obecnie prezentowanej pracy wykazano zależność pomiędzy zakażeniem *H. pylori* u kawii domowych lub ekspozycją komórek nabłonkowych tych zwierząt w hodowlach *in vitro* na komponenty tych bakterii, w tym LPS a nasileniem procesu apoptozy **[publikacja II],** *(Unger i wsp. 2001).* Wydaje się, oprócz LPS *H. pylori* lub kwasu moczowego iż działanie adiuwantowi może mieć również sama sekwencja TTT**ATVLA**RS, wspólne dla białka HspB *H. pylori* i ludzkiego białka Hsp60. Wykazano bowiem, że peptyd P1 stymulował ludzkie monocyty THP1XBlue™ do wytwarzania cytokin prozapalnych: TNFα, IL-1, IL-2 i IL-12.

Na rolę zakażenia *H. pylori* w inicjowaniu powstawania przeciwciał krzyżowo-reagujących z ludzkim białkiem Hsp60 wskazują także wyniki badań przeprowadzonych na modelu kawii domowych zakażonych eksperymentalnie tymi bakteriami. Tylko u zwierząt inokulowanych *H. pylori,* ale nie u zwierząt kontrolnych, wykazano występowanie w surowicach przeciwciał wiążących w teście ELISA peptyd P1.

IgG anty-P1 występujące w surowicach ludzkich lub w surowicach kawii domowych były wychwytywane z nich podczas absorpcji pałeczkami *H. pylori*, co potwierdza, że bakterie te były źródłem antygenu stymulującego wytwarzanie przeciwciał anty-P1. Podobnie, w badaniach *Nakagawy i wsp. (2005),* przeciwciała anty-Hsp60 indukowane u myszoskoczków mongolskich zakażonych *H. pylori* były neutralizowane przez absorpcję surowic zawiesiną tych bakterii *(Nakagawa i wsp. 2005).*

Choć z przeprowadzonych badań wynika, iż podczas zakażenia *H. pylori* bakteryjne białko HspB indukuje powstawanie przeciwciał zdolnych do wiązania białka Hsp60, ludzkiego lub kawii domowych, to poznanie roli przeciwciał IgG anty-P1 w patogenezie zapalenia błony śluzowej żołądka lub ChNS, na tle zakażenia *H. pylori* wymaga dalszych badań. Można rozważać, iż przeciwciała takie mogą osłabiać kolonizację *H. pylori*, co było by korzystne dla gospodarza. Jednake mogą również wzmagać reakcję zapalną w wyniku odkładania się kompleksów immunologicznych i indukowania przez nie reakcji cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Powstawanie kompleksów immunologicznych Lewis X/-IgG anty-LewisX lub Lewis Y/-IgG anty-LewisY podczas zakażenia *H. pylori* wykazali poprzednio *Grebowska i wsp. (Grebowska i wsp. 2006).*. Można również rozważać, iż domena ATVLA HspB *H. pylori* może promować odpowiedź zapalną poprzez aktywację komórek immunokompetentnych. Wykazanie korelacji pomiędzy występowaniem oraz poziomem IgG anty-P1 w surowicach pacjentów z objawami dyspepsji lub z ChNS a markerami zapalenia błony śluzowej żołądka lub miażdżycy byłoby przydatne w wyjaśnieniu roli biologicznej takich przeciwciał. W prezentowanych badaniach poziom przeciwciał anty-Hsp60 był wyższy u pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori*, niż u pacjentów zakażonych *H. pylori* z zapaleniem błony

śluzowej żołądka i objawami dyspepsji, a także u osób zdrowych, co wskazuje na znaczenie toczącego się procesu chorobowego, w tym lokalnej i/lub ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, w indukcji takich przeciwciał.

Podsumowując, w pracy oceniono występowanie w surowicach osób zdrowych, pacjentów z objawami dyspepsji oraz pacjentów z ChNS, zakażonych lub niezakażonych H. pylori, przeciwciał przeciwko sekwencji wspólnej białka HspB tych bakterii i ludzkiego białka Hsp60. Uzyskane wyniki wskazują na znaczenie pałeczek H. pylori w indukcji takich przeciwciał, zwłaszcza u pacjentów z ChNS. Na modelu kawii domowych potwierdzono znaczenie eksperymentalnego zakażenia H. pylori w indukcji takich przeciwciał. Można przypuszczać, iż przeciwciała przeciwko sekwencji wspólnej HspB H. pylori i ludzkiego białka Hsp60, potencjalnie auto-reaktywne, mogą sprzyjać nasilaniu procesu zapalnego toczącego się w śródbłonku naczyniowym, w rozwoju ChNS.

Podsumowanie wyników

I. Efekty oddziaływania *H. pylori* na barierę nabłonkową żołądka w badaniach *in vivo* i *in vitro* [publikacja I-III]

Wykazano:

1. Rozwój zakażenia *H. pylori* u kawii domowych po inokulacji drogą pokarmową, utrzymującego się przez 28 dni od podania bakterii, potwierdzonego metodami histopatologicznymi oraz na podstawie wyznaczników serologicznych.
2. Znaczenie MUC5AC oraz występujących w mucynie determinantów LeX i LeY w kolonizacji błonie śluzowej żołądka kawii domowych przez *H. pylori.*
3. Zależność pomiędzy nasileniem wytwarzania MUC5AC i depozycja determinantów LeX i LeY a efektywnością kolonizacji, co może sprzyjać utrwaleniu zakażenia.
4. Znaczenie determinantów antygenowych LeX i LeY występujących w *LPS H. pylori,* w adhezji tych bakterii do komórek nabłonkowych żołądka kawii domowych.
5. Rozwój reakcji zapalnej w nabłonku żołądka u kawii domowych *zakażonych H. pylori* powiązanej we wczesnym etapie zakażenia z infiltracją granulocytów oraz limfocytów T CD4+, a późnej fazie limfocytów T CD8+ i powstawaniem pęcherzyków limfocytarnych.
6. Zależność pomiędzy kolonizacją nabłonka żołądka kawii domowych przez *H. pylori,* rozwojem reakcji zapalnej a nasileniem stresu oksydacyjnego i apoptozy komórek tej bariery, zaszcza we wczesnej fazie zakażenia.
7. Nasilenie apoptozy komórek bariery nabłonkowej kawii domowych w środowisku egzogennej MMP-9, której źródłem *in vivo* są infiltrujące nabłonek komórki immunokompetentne.
8. Udział IL-33 w procesie zapalnym bariery nabłonkowej żołądka kawii domowych, która ulega dezintegracji wskutek apoptozy podczas zakażenia *H. pylori,*

wyrażającym się nasileniem migracji oraz proliferacji i zahamowaniem apoptozy komórek.

9. Zróżnicowanie skuteczności procesów naprawczych bariery nabłonkowej żołądka kawii domowych w zależności od środowiska komponentów *H. pylori:* osłabienie po ekspozycji na LPS a nasilenie w środowisku antygenów powierzchniowych ekstraktu glicynowego, co może mieć istotne znaczenie w związku z wyspowym charakterem zakażenia *H. pylori.*

II. Ogólnoustrojowe skutki zakażenia [publikacja IV i V]

Wykazano:

1. Występowanie sekwencji wspólnej ATVLA w białku HspB *H. pylori* i ludzkim białku Hsp60.
2. Indukowanie podczas zakażenia *H. pylori* przeciwciał krzyżowo-reagujących z białkiem HspB *H. pylori* i ludzkim białkiem Hsp60 oraz peptydu zawierającym ich wspólną sekwencję ATVLA.
3. Prozapalną aktywność peptydu zawierającego sekwencję ATVLA wyrażającą się pobudzeniem monocytów do wydzielania cytokin: TNF-α, IL-1, IL-2 oraz IL-12.

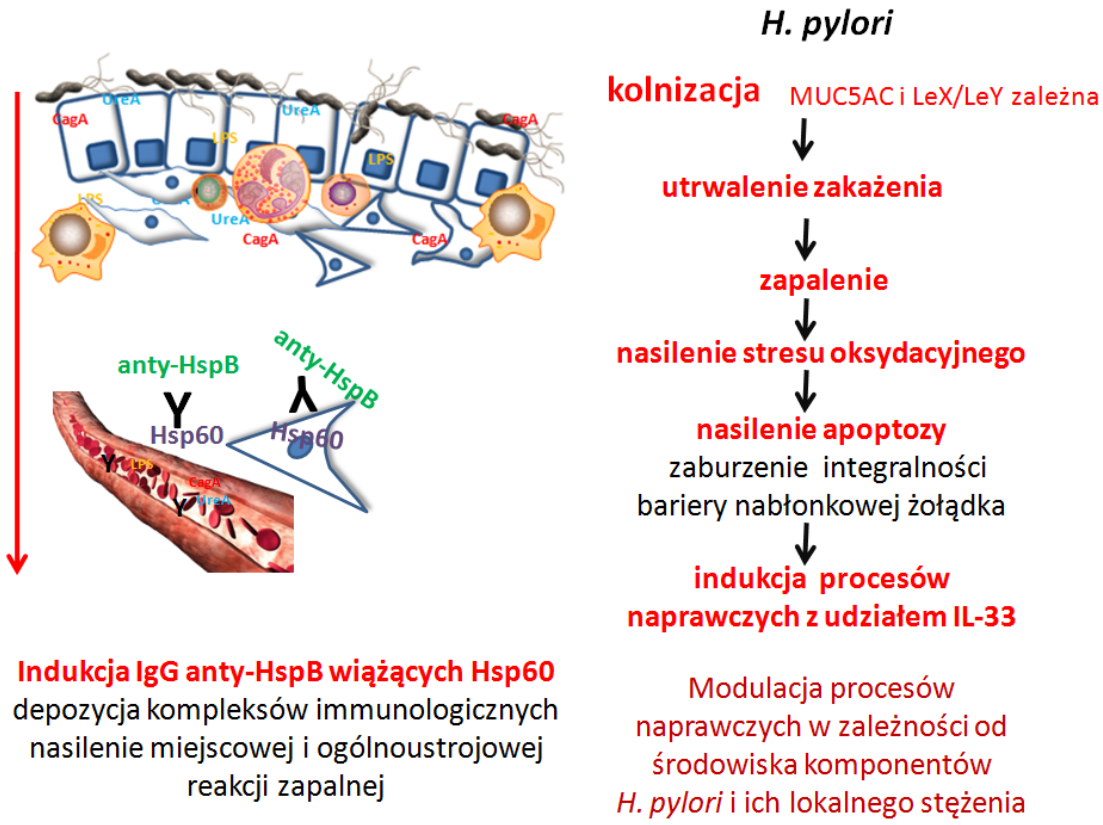
Podsumowując, uzyskane w pracy wyniki na modelu zakażenia *H. pylori* u kawii domowych oraz na modelach komórkowych *in vitro* pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka kawii domowych lub fibroblastów pozwalają sugerować, że w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* na poziomie bariery nabłonkowej żołądka nasilane jest wytwarzanie mucyny 5 i determinantów antygenowych LeX i LeY, co sprzyja kolonizacji i utrwaleniu zakażenia.

Zakażenie *H. pylori* powiązane jest z rozwojem reakcji zapalnej, nasileniem stresu oksydacyjnego oraz apoptozy komórek bariery nabłonkowej żołądka, co może sprzyjać zaburzeniu integralności tej bariery. Nasilenie apoptozy może wynikać z konieczności ograniczenia reakcji zapalnej, która jest nadmierna podczas zakażenia *H. pylori,* służy także kontroli procesów neoplastycznych.

W odpowiedzi na nasilenie stresu oksydacyjnego i apoptozy czemu towarzyszy zaburzenie integralności bariery nabłonkowej żołądka, indukowane są procesy naprawcze. Ich postęp zależy od typu komponentów *H. pylori* działających na nabłonek oraz cząsteczek sygnałowych gospodarza. Czynnikiem gospodarza zaangażowanym w proces naprawczy jest IL33, która nasila migrację i proliferację

komórek a hamuje apoptozę komórek. O ile hamowanie przez IL-33 apoptozy komórek może mieć działanie korzystne dla regeneracji bariery nabłonkowej żołądka to taka właściwość może promować wzrost komórek zmienionych wskutek mutacji. Jest to szczególnie ważnie, ponieważ pałeczki *H. pylori* inicjują rozwój raka żołądka.

Podczas zakażenia *H. pylori* indukowane są przecwiała IgG anty-HspB *H. pylori,* które wiążą Hsp60 ludzkie, co potencjalnie może skutkować a także depozycją kompleksów immunologicznych w nabłonku żołądka, a zwłaszcza w naczyniach objętych procesem arteriosklerozy i nasileniem reakcji zapalnej zarówno lokalnej jak i ogólnoustrojowej wskutek aktywacji dopełniacza na drodze klasycznej. Wykazane w pracy efekty zestawiono na **Rycinie 3.**



Rycina 3. ***Konsekwencje zakażenia H. pylori na modelu kawii domowych in vivo oraz modelach komórkowych in vitro.***

Wniosek końcowy

Na modelu eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych oraz modelach komórek nabłonkowych żołądka i fibroblastów tych zwierząt wykazano zależność pomiędzy efektywnością kolonizacji a nasileniem wytwarzania MUC5AC wraz z determinantami Lewis X i Lewis Y, rozwojem reakcji zapalnej, nasileniem stresu oksydacyjnego i apoptozy, rolą tych procesów w zaburzaniu integralności bariery nabłonkowej żołądka. Wykazano znaczenie IL-33 w indukowaniu procesów naprawczych tej bariery. Ponadto wykazano, że konsekwencją uszkodzenia nabłonka żołądka i rozwoju reakcji zapalnej w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* jest indukcja przez białko HspB tych bakterii przeciwciał krzyżowo-reagujących z białkiem Hsp60 gospodarza. Przeciwciała takie mogą sprzyjać nasileniu reakcji zapalnej zarówno miejscowej jak i ogólnoustrojowej poprzez tworzenie kompleksów immunologicznych i aktywację białek dopełniacza z ich udziałem.

Literatura

1. Aceti A, Celestrino D, Caffero M. **(1991)** Basofil-bound and serum immunoglobulin E directed against *H. pylori* in patients with chronic gastritis. *Gastroenterol*. 101: 131-137.

2. Allaker RP, Young KA, Hardie JM, Domizio P, Meadows NJ. **(2002)** Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol*.51:312-317.

3. Allen LAH. **(2007)** Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. Journal compilation. Blackwell Publishing Ltd. *Cell Microbiol.* 9: 817–828.

4. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock REW, Trust TJ. **(2002)** Comparative genomics of *Helicobacter pylori:* Analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun.* 68: 4155–4168.

5. Al-Sulami AA, Kiat HS, Bakker LK, Hunoon H. **(2008)** Primary isolation and detection of *Helicobacter pylori* from dyspeptic patiens: a simple, rapid method. *Eastern Mediterranean Health Journal.*14:268-275.

6. Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, van der Zee R, Telford JL, Vandenbroucke-Grauls CM, D'Elios MM, Del Prete G**. (2003)** Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H+,K+-adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med.* 198:1147-1156.

7. Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elios MM, Del Prete G. **(2006)** The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest.* 116:1092–1101.

8. Amieva MR, El-Omar EM. **(2008)** Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 134:306–323.

9. Anderl F, Gerhard M. **(2014)** *Helicobacter pylori* vaccination: is there a path to protection? *World J Gastroenterol*. 20:11939–11949.

10. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A. **(2005)** Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 9247-9252.

11. Appelmelk BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, De Vries T, Quan H, Verboom T, Maaskant JJ, Ghiara P, Kuipers EJ, Bloemena E, Tadema TM, Townsend RR, Tyagarajan K, Crothers JM, Monteiro MA, Savio A, De Graaff J. **(1996)** Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun.* 64: 2031-2040.

12. Appelmelk BJ, Negrini R, Moran AP, Kuipers EJ. **(1997)** Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol*. 5: 70-73.

13. Appelmelk BJ, Monteiro MA, Martin SL, Moran AP, Vandenbroucke-Grauls CM. **(2000)**Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens? *Trends Microbiol.* 8:565-570.

14. Arabski M, Konieczna I, Sołowiej D, Rogoń A, Kolesińska B, Kamiński Z, Kaca W. **(2010)** Are anti-*Helicobacter pylori* urease antibodies involved in atherosclerotic diseases? *Clin Biochem.* 43: 115-123.

15. Armstrong JA, Wee SH, Goodwin CS, Wilson DH. **(1987)** Response of *Campylobacter pyloridis* to antibiotics, bismuth and an acid reducing agent *in vitro*—an ultrastructural study. *J Med Microbiol.* 24:343-350.

16. Ashktorab H, Dashwood RH, Dashwood MM, Zaidi SI, Hewitt SM, Green WR, Lee EL, Daremipouran M, Nouraie M, Malekzadeh R, Smoot DT. **(2008)** *H. pylori*-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria. *Helicobacter.*13: 506-517.

17. Aspholm M, Olfat FO, Nordén J, Sondén B, Lundberg C, Sjöström R, Altraja S, Odenbreit S, Haas R, Wadström T. **(2006)** SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog. 2*, e110.

18. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL **(1995)** Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration*. J Biol Chem.* 270:17771-17777.

19. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. **(1997)** Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 112: 92-99.

20. Backert S, Naumann M. **(2010)** What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*. 18: 479-486.

21. Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N. **(2011)** Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal.* 9: 28.

22. Bäckhed F, Torstensson E, Seguin D, Richter-Dahlfors A, Rokbi B. **(2003)** *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-8 receptor expression in the human gastric epithelium. *Infect Immun*. 71: 3357-3360.

23. Bäckström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Borén T, Arnqvist A. **(2004)**Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Asci USA*.101:16923–16928.

24. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL,Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. **(2003)** Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 163:69-79.

25. Bagchi DTR, McGinn X, Bagchi YeM, Krohn RL, Chatterjee A, Stohs SJ**. (2002)** *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci.*47:1405-1412.

26. Bąk-Romaniszyn L, Małecka-Panas E. **(2007)** Zakażenie *Helicobacter pylori* u dzieci – przebieg kliniczny, postępowanie diagnostyczne i leczenie*. Przewodnik Lekarski.* 1:94-102.

27. Beltrán-Anaya FO, Poblete TM, Román-Román A, Reyes S, de Sampedro J, Peralta-Zaragoza O, Rodríguez MÁ, del Moral-Hernández O, Illades-Aguiar B, Fernández-Tilapa G. **(2014)** The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. *BMC Gastroenterol*. 14: 223-229.

28. Benagiano M, D'Elios MM, Amadei A, Azzurri A, van der Zee R, Ciervo A, Rombolà G, Romagnani S, Cassone A, Del Prete G**. (2005)** Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. *J Immuno.* 174: 6509–6517.

29. Bergman MP, Engering A, Smits HH, Vliet SJ, Bodegraven AA, Wirth H, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Kooyk Y, Appelmelk BJ. **(2004)** *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med*. 8: 979-990.

30. Bernard M, D'Elios MM. **(2001)** The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: friend or foe? *Toxicon*. 56: 1186–1192.

31. Berstad AE, Kilian M, Valnes KN, Brandtzaeg P. **(1999)** Increased mucosal production of monomeric IgA1 but no IgA1 protease activity in *Helicobacter pylori* gastritis. *Am J Pathol*. 155: 1097-1104.

32. Beswick EJ, Pinchuk IV, Minch K, Suarez G, Sierra JC, Yamaoka Y, Reyes VE. **(2006)** The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect Immun.* 74.

33. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. **(2006a)** *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 12: 5599-5605.

34. Betten A, Bylund J, Cristophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C. **(2001)** A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Investig.* 108:1221-1228.

35. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. **(2002)** Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J.* 368:121-129.

36. Bielański W, Konturek SJ. **(1996)** New approach to ^{13}C urea breath test capsule-based modification with low dose of ^{13}C urea in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol*. 47: 545-553.

37. Bimczok D, Smythies LE, Waites KB, Grams JM, Stahl RD, Mannon PJ, Shajan P, Wilcox CM,Harris PR,Das S,Ernst PB, Smith PD. **(2013)** *H. pylori* infection inhibits phagocyte clearance of apoptotic gastric epithelial cells. *J Immunol.* 15:6626–6634.

38. Birkholz S, Schneider T, Knipp U, Stallmach A, Zeitz M. **(1998)** Decreased *Helicobacter pylori*-specific gastric secretory IgA antibodies in infected patients.*Digestion.* 59: 638-645.

39. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. **(1993)** The coccoid forms of*Helicobacter pylori.* Criteria for their viability. *Epide. Inf.* 111: 483-490.

40. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, Baldari CT. **(2003)** The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med.* 198: 1887-1897.

41. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. **(1989)** PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 73: 1109–1112.

42. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. **(1993)**Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262: 1892-1895.

43. Borkakoti N. **(2000)** Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med.*78: 261-268.

44. Bor-Shyang S, Odenbreit S, Kuei-Hsiang H, Jiunn-Jong W. **(2006)** Interaction between host gastric sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients. *The Am J Gastroenterol.*101: 36-44.

45. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. **(2008)** Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immun*.1: 31-37.

46. Brisslert M, Enarsson K, Lundin S, Karlsson A, Kusters JG, Svennerholm AM, Backert S, Quiding-Järbrink M. **(2005)** *Helicobacter pylori* induce neutrophil transendothelial migration: role of the bacterial HP-NAP. *FEMS Microbiol Lett.* 249: 95–103.

47. Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Pee D, Gail MH. **(2002)***Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int J Epidemiol*. 31: 638-645.

48. Brzozowski T. **(2006)** Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za rok 2005. *Med Prakt*. 2: 24-28.

49. Bury-Moné S, Kaakoush NO, Asencio C, Mégraud F, Thibonnier M, De Reuse H, Mendz GL. **(2006)** *Is Helicobacter pylori a true microaerophile?*. *Helicobacter.* 4: 296-303.

50. Buzzelli JN, Chalinor HV, Pavlic DI, Sutton P, Menheniott TR, Giraud AS, Judd LM. **(2015)** IL33 Is a Stomach Alarmin That Initiates a Skewed Th2 Response to Injury and Infection. *Cell Mol Gastroentro Hep*. 1: 203–221.

51. Calvino-Fernandez M, Benito-Martinez S, Parra-Cid T. **(2008)** Oxidative stress by *Helicobacter pylori* causes apoptosis through mitochondrial pathway in gastric epithelial cells. *Apoptosis*. 13:1267–1280.

52. Cambi A, Figdor C. **(2005)** Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins. *Curr Opin Immunol*. 17: 345-351.

53. Cappon A, Babolin C, Segat D, Cancian L, Amedei A, Calzetti F, Cassatella MA, D'Elios MM, de Bernard M. **(2010)** *Helicobacter pylori*-derived neutrophil-activating protein increases the lifespan of monocytes and neutrophils. *Cell Microbiol*. 12: 754–764.

54. Caron TJ, Scott KE, Fox JG, Hagen SJ. **(2015)** Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal barrier. *World J Gastroenterol*.21: 11411–11427.

55. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Ewoldt RH, McKinley GH, Bansil R, Erramilli S. **(2007)** Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules.* 8: 1580-1586.

56. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, Ewoldt RH, McKinley GH, So P, Erramilli S, Bansil R. **(2009)** *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 14321-14326.

57. Chalubinski M, Wojdan K, Luczak E, Gorzelak P, Borowiec M, Gajewski A, Rudnicka K, Chmiela M, Broncel M. **(2015)** IL-33 and IL-4 impair barier function of human vascular endothelium via different mechanisms. *Vasc Pharmacol.* 73: 57–63.

58. Chandra K, Salman S, Al Abid M, Rajpoot S, Ali Khan N. **(2015)** Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and in vitro anti-arthritic potential of costus speciosus Rhizome Extract. *Int J Phar Phytochem Res*. 7: 383–389.

59. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Pestell RG, Blaser MJ, Chen CC. **(2006)** Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. *Cell Microbiol.* 8: 1740-1752.

60. Chattopadhyay R, Bhattacharyya A, Crowe SE. **(2010)** Dual regulation by apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 inhibits gastric epithelial cell apoptosis during *Helicobacter pylori* infection. *Cancer Re.s* 70: 2799–2808.

61. Chen J, Lin M, Li N, Lin L, She F. **(2012)** Therapeutic vaccination with *Salmonella*-delivered codon-optimized outer inflammatory protein DNA vaccine enhances protection in *Helicobacter pylori* infected mice. *Vaccine.* 30:5310–5315.

62. Cheng HH, Tseng GY, Yang HB, Wang HJ, Lin HJ, Wang WC. **(2012)** Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 18: 34-43.

63. Cheng YS, Kuang LP, Zhuang CL, Jiang JD, Shi M. **(2015)** Effects of cytotoxin-associated gene A (CagA) positive *Helicobacter pylori* infection on anti-platelet glycoprotein antibody producing B cellsin patients with primary idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP). *Pak J Med Sci.* 31: 121-126.

64. Chmiela M, Wadstrom T, Folkesson H, Płaneta Małecka I, Czkwianianc E, Rechciński T, Rudnicka W. (**1998)** Anti-Lewis X antibody and Lewis X-anti-Lewis X immune complexes in *Helicobacter pylori* infection. *Immunol Lett*. 61: 119-125.

65. Chmiela M, Jurkiewicz M, Wiśniewska M, Czkwianianc E, Płaneta-Małecka I, Rechciński T, Rudnicka W. **(1999)** Anti-Lewis X IgM and IgG in *H. pylori* infections in children and adults. *Acta Microbiol Pol*. 48: 277-281.

66. Chmiela M, Kowalewicz-Kulbat M, Miszczak A, Wisniewska M, Rechcinski T, Kolodziej K, Kasprzak J, Wadstrom T, Rudnicka W. **(2003)** A link between *Helicobacter pylori* and/or *Chlamydia spp.* infections and atherosclerosis*. FEMS Immunol Med Microbiol*. 36: 187-192.

67. Chmiela M, Wiśniewska M, Bąk-Romaniszyn L, Rechciński T, Płaneta-Małecka I, Bielański W, Konturek SJ, Płonka M, Klink M, Rudnicka W. **(2003a)** Serological differentiation of *Helicobacter pylori* CagA(+) and CagA(-) infections. *Arch Immunol Ther Exp*. 51: 131-136.

68. Chmiela M, Miszczyk E, Rudnicka K. **(2014)** Structural modifications of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace. *World J Gastroenterol*. 20: 9882–9897.

69. Chmiela M, Gajewski A, Rudnicka K. **(2015)** *Helicobacter pylori* vs coronary heart disease - searching for connections. *World J Cardiol*. 7: 187-203.

70. Chmiela M, Gonciarz W. **(2017)** Molecular mimicry in *H. pylori* infections.*World J Gastroenterol*. 23: 3964–3977.

71. Chmiela M, Walczak N, Rudnicka K. **(2018)** *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles involvement in the infection development and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Biomed Sci.*25: 78.

72. Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. **(2003)** Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Toxicology*. 42:601–611.

73. Claeys D, Faller G, Appelmelk BJ, Negrini R, Kirchner T. **(1998)** The gastric H+,K+-ATPase is a major autoantigen in chronic *Helicobacter pylori* gastritis with body mucosa atrophy. *Gastroenterology.* 115: 340-347.

74. Clement MV, Pervaiz S. **(1999)** Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis. *Free Radic Res.* 30:247-252.

75. Collins HM, Morris TM, Watson SA. **(2001)** Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer.* 84: 1664–1670.

76. Cooke CL, An HJ, Kim J, Canfield DR, Torres J, Lebrilla CB, Solnick JV. **(2009)** Modification of gastric mucin oligosaccharide expression in *Rhesus macaques* after infection with *Helicobacter pylori.Gastroenterology.* 137: 1061–1071.

77. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. **(2001)** The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 22: 633-640.

78. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. **(1993)** Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 5791-5795.

79. Cover TL, Blaser MJ. **(1992)** Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 267: 10570-10575.

80. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. **(1994)** Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains*. JBiol Chem.* 269: 10566-10573.

81. Cover TL. **(1996)** The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 20:241-246.

82. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek R M. **(2003)** Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* 63: 951-957.

83. Cover TL, Blanke SR**. (2005)** *Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol*. 3**:**320-*332*

84. Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JI. **(1991)** Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut*. 32: 1473-1477.

85. Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, Ramsay N, Primrose JN, Lindley IJ. **(1994)** Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol*. 47: 61-66.

86. D'Elios MM, Appelmelk BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. **(2004)** Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol Med.*10: 316-323.

87. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. **(1999)** High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibodypositive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 4062-4067.

88. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. **(2008)** Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: a clinically oriented review. *J Clin Endocrinol Metab*. 93: 363-371.

89. De Foneska, A, Kaunitz JD. **(2010)** Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol.* 26: 604-610.

90. De Paulis A, Prevete N, Rossi FW, Rivellese F, Salerno F, Delfino G, Liccardo B, Avilla E, Montuori N, Mascolo M, Staibano S, Melillo RM, D'Argenio G, Ricci V, Romano M, Marone G. **(2009)** *Helicobacter pylori* Hp(2-20) promotes migration and proliferation of gastric epithelial cells by interacting with formyl peptide receptors *in vitro* and accelerates gastric mucosal healing in vivo. *J Immunol*. 183: 3761-3769.

91. Del Prete G, Chiumiento L, Amedei A, Piazza M, D'Elios MM, Codolo G, de Bernard M, Masetti M, Bruschi F. **(2008)** Immunosuppression of TH2 responses in *Trichinella spiralis* infection by *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Allergy Clin Immunol*. 122: 908–913.

92. Delaney B, Ford A, Forman D, Moayyedi P, Qume M. **(2005)** Initial management strategies for dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev*. 19:CD001961.

93. D'Elios MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, de Bernard M. **(2007)** The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50:157–164.

94. Dent JC, McNulty CA. **(1988)** Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur JClin Microbiol Infect Dis.* 7:555-558.

95. Deroń E, Kieć-Świerczyńska M. **(2002)** *Rola Helicobacter pylori w powstawaniu chorób skóry.Medycyna Pracy*. 53: 333-337.

96. Ding SZ, Minohara Y, Fan XJ, Wang J, Reyes VE, Patel J, Dirden-Kramer B, Boldoqh I, Ernst PB, Crowe SE. **(2007)** *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells.*Infect Immun* 75:4030–4039.

97. Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G,Graham DY. **(2001)** Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep—implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol.* 96:1396-1401.

98. Drake IM, Mapstone NP, Schorah CJ, White KLM, Chalmers DM, Dixon MF, Axon ATR. **(1998)** Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H. pylori* eradication. *Gut.* 42:768-771.

99. Du SY, Wang HJ, Cheng HH, Chen SD, Wang LH, Wang WC. **(2016)** Cholesterol glucosylation by *Helicobacter pylori* delays internalization and arrests phagosome maturation in macrophages. *J Microbiol Immunol*. 49:636–645.

100. Dunn BE, Phadnis SH. **(1998)** Structure, Function and Localization of *Helicobacter pylori* Urease. *Yale J Biol Med.* 71: 63-73.

101. Dzieniszewski J, Jarosz M. **(2004)** Grupa Robocza PTG. Postępowanie w zakażeniu *Helicobacter pylori*. Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii. *Gastroenterol Pol*. 11: 41-48.

102. Dziurkowska-Marek A., Marek T. **(2008)** Zakażenie *Helicobacter pylori.* Aktualne wytyczne postępowania. *Lekarz.* 11:80-85.

103. El-Eshmawy MM, El-Hawary AK, Abdel Gawad SS, ElBaiomy AA. **(2011)** *Helicobacter pylori* infection might be responsible for the interconnection between type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis. *Diabetol Metab Syndr.* 3: 28.

104. Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, Morelli G, Gressmann H, Achtman M, Schuster SC. **(2006)** Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet*. 2: 120.

105. Eshun JK, Black DD, Casteel HB, Horn H, Beavers-May T, Jetton CA, Parham DM. **(2001)**Comparison of immunohistochemistry and silver stain for the diagnosis of pediatric *Helicobacter pylori* infection in urease-negative gastric biopsies*. Pediatric and Develop Pathol*. 4: 82-88.

106. Esmaeilli D, Mobarez AM, Salmanian AH, Hosseini AZ. **(2013)**Boiactivity and immunological evaluation od LPS from different serotypes of *Helicobacter pylori*. *Iran J Microbiol.* 5: 142-146.

107. Evans DJ, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kvietys PR. **(1995)** Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun*. 63:2213–2220.

108. Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. **(1992)**The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci.* 101:219-231.

109. *Evans MD, Cooke MS. **(2004)** Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. BioEssays. 26: 533–542.*

110. Evans SY, Rock KL. **(2003)** Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 425:516–521.

111. Exner MM, Doig, P, Trust TJ, Hancock RE. **(1995)** Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*63: 1567–1572.

112. Facchini LM, Penn LZ. **(1998)**The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J*. 12:633–51.

113. Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S. **(2001)** Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori:* estimates of clock rates, recombination size and minimal age. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98**:**15056-15061.

114. Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. **(1998)** The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med.* 187: 1659-1669.

115. Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. **(2000)** *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol.*165: 1918-1924.

116. Fan XJ, Chua A, Shahi CN, McDevitt J, Keeling PW, Kelleher D. **(1994)** Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H pylori* colonisation. *Gut*. 35: 1379-1384.

117. Farnham KR, Dube DH. **(2015)** A semester-long project-oriented biochemistry laboratory based on *Helicobacter pylori* urease.*Bioch Mol Biol Educ*. 43: 333–340.

118. Ferrara N. **(2004)** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 25: 581–611.

119. Fetissov SO, Hamze Sinno M, Coëffier M, Bole-Feysot C, Ducrotté P, Hökfelt T, Déchelotte P. **(2008)** Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition* 24: 348-359.

120. Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Pumphrey C, Casteel HB, Evans DJ, Graham DY. **(1991)** Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics.* 88: 578-582.

121. Fischer W, Prassl S, Haas R. **(2009)** Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori.Curr Top Microbiol Immunol.* 337: 129–171.

122. Fitchen N, Letley DP, O'Shea P, Atherton JC, Williams P, Hardie KR. **(2005)** All subtypes of the cytotoxin VacA adsorb to the surface of *Helicobacter pylori* post-secretion*. J Med Microbiol.* 54:621-63.

123. Flach CF, Svensson N, Blomquist M, Ekman A, Raghavan S, Holmgren J. **(2011)** A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against *Helicobacter pylori. Vaccine.* 29: 1235–1241.

124. Florence JM, Krupa A, Booshehri LM, Allen TC, Kurdowska AK. **(2017)** Metalloproteinase-9 contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis via protease activated receptor-1. *PLoS One*. 6: 12.

125. Franceschi F, Sepulveda AR, Gasbarrini A, Pola P, Silveri NG, Gasbarrini G, Graham DY, Genta RM. **(2002)** Cross-reactivity of anti- CagA antibodies with vascular wall antigens: possible pathogenic link between *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis. *Circulation.*106: 430-434.

126. Fu HW. **(2014)** *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein: From molecular pathogenesis to clinical applications. *World J. Gastroenterol.* 20: 5294-5301.

127. Fujinami RS, Oldstone MB. **(1985)** Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* 230: 1043-1045.

128. Fukui H, Franceschi F, Penland RL, Sakai T, Sepulveda AR, Fujimori T**. (2003)** Effects of *Helicobacter pylori* infection on the link between regenerating gene expression and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Lab Invest*. 83: 1777-1786.

129. Gajewski A, Mnich E, Szymanski K, Hinc K, Obuchowski M, Moran AP, Chmiela M. **(2016)** *Helicobacter pylori* antigens, acetylsalicylic acid, LDL and 7-ketocholesterol – their potential role in destabilizing the gastric epithelial cell barrier. An in vitro model of Kato III cells. *Acta Bioch Pol.* 63: 45–152.

130. Gajewski A, Gonciarz W, Hinc K, Obuchowski M, Chmiela M. **(2018)** Dysfunction of gastric barier in the milieu of 7-ketocholesterol, acetylsalicylic acid and *Helicobacter pylori* compounds. Potential implications in the development of coronary heart disease. *Helicobacter.* 23: 65.

131. Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione R, Landolfi R, Pola P, Gasbarrini G. **(1998)** Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.*352: 878.

132. Ge Z, Hiratsuka K, Taylor DE. **(1995)** Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. *Mol Microbiol.* 15: 97-106.

133. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. **(2003)** *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.*301:1099-1102.

134. Geijtenbeek TBH, Engering A, Kooyk Y. **(2002)** DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology.*J Leukoc Biol*. 71: 921-931.

135. Genta RM, Hamner HW, Graham DY. **(1993)** Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol*. 24: 577-583.

136. George J, Afek A, Gilburd B, Harats D, Shoenfeld Y. **(2000)** Autoimmunity in atherosclerosis: lessons from experimental models. *Lupus* 9: 223-227.

137. Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof J, Mendonça S, van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr, Kusters JG. **(2006)** Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 11: 181-187.

138. Głaczyńska M. **(2017)** Analiza zróżnicowania komórek immunokompetentnych podczas zakażenia *Helicobacter pylori* na modelu kawii domowych. *Praca magisterska wykonana w Pracowni Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki.*

139. Gonciarz W, Tomaszewska A, Rechciński T, Krupa A, Chmiela M. **(2020)** Antibodies crossreacting with human TNF-α receptor inducedin the patients with coronary heart disease by *Helicobacter pylori* CagA positive strains. *European Society of Cardiology Congress.* 29-31.2020 r. Amsterdam, Holandia.

140. Graham DY, Opekun AR, Klein PD. **(1993)** Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori. J Clin Gastroenterol.* 16: 292-294.

141. Grębowska A, Moran AP, Matusiak A, Bąk-Romaszyn L, Czekwaniec E, Rechciński T, Walencka M, Małecka-Panas I, Rudnicka W, Chmiela M. **(2008)** Anti-phagocitic activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide (LPS) – possible modulation of the innate immune response to these bacteria. *Pol. J Microbiol.* 57:185-192.

142. Grębowska A, Moran AP, Bielański W, Matusiak A, Rechciński T, Rudnicka K, Baranowska A, Rudnicka W, Chmiela M. **(2010)** *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activity in human periphenol blond mononuclear leukocyte cultures*. J Physiolog Pharmacol.* 61: 437-442.

143. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almazar G, Wick MC, Wick G. **(2011)** Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Artherioscler Tromb Vasc Biol.*31:960–968.

144. Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. **(2010)** *Helicobacter* pylori diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *Europ J Pediat.* 169: 15-25.

145. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. **(2005)** *Helicobacter pylori* and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? *J Cell Mol Med.* 9: 741-744.

146. Gunn MC, Stephens JA, Stewart BJ, Rathbone, West KP. **(1998)** The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration*. J Clin Pathol.* 51:761-764.

147. Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. **(2011)** Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *Helicobacter pylori.W.S. Maney & Son Ltd.* 16: 1-7.

148. Haq M, Shaeii AE, Zervos EE, Rosemurgy AS. **(2000)** *In vitro* and *in vivo* matrix metalloproteinase production by pancreatic cancer cells and by distant organs. *Int J Surg Invest.* 1: 459–465.

149. Hartog G , Chattopadhyay R., Ablack A, Hall EH, Butcher LD, Bhattacharyya A, Eckmann L., Harris PR, Das S, Peter B, Sheila EE. **(2016)** Crowe regulation of Rac1 and reactive oxygen species production in response to infection of gastrointestinal epithelia .*PLoS Pathog.* 12: e1005382.

150. Heneghan MA, McCarthy CF, Moran AP. **(2000)** Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. *Infect Immun*. 68: 937–941.

151. Hinc K, Isticato R, Dembek M, Karczewska J, Iwanicki A, Peszynska-Sularz G, De Felice M, Obuchowski M, Ricca E. **(2010)**Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Microb Cell Fact*. 9: 2.

152. Hirota K, Kanitani H, Nemoto K, Ono T, Miyake Y. **(1995)** Crossreactivity between human sialyl Lewis(x) oligosaccharide and common causative oral bacteria of infective endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*12: 159-164.

153. Hitchcock PJ, Brown TM. **(1983)** Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol.* 154: 269-277.

154. Ho B, Marshall BJ. **(2000)** Accurate diagnosis of*Helicobacter pylori.* Serologic testing. *Gastroenterol Clin North Am.* 29: 853-862

155. Hodge S, Hodge G, Scichitano R, Reynolds PN, Holmes M. **(2003)**Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell.*81:289–296.

156. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M. **(2003)** The adaptive imbalance in base excision–repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Investig.* 112: 1887–1894.

157. Honda ST, Fujioka M, Tokieda T, Gotoh A, Nishizono M**. (1998)** Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol.* 33**:**454-*460.*

158. Hrabec E, Naduk J, Stręk M, Hrabec Z. **(2007)** Kolagenazy typu IV (MMP- 2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokin, hemokiny i ich receptory. *Post Bioch*. 53: 37–45.

159. Hua-Xiang H, Lam SK, Huang XR, Wong WM, Leung SY, Yuen ST, Lan HY, Wong CY. **(2004)***Helicobacter pylori* infection is associated with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor - by epithelial cells, T cells, and macrophages - in gastric mucosa. *J Infect Dis*. 190: 293-302.

160. Hunt RH, Xiao SD, Mégraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, Vaz Coelhol G, Fock M, Fedain S, Cohen H, Malfartheiner P, Vakil N, Hamid S, Goh KL, Wong BCY, Krabshuis J.**(2010)***Helicobacter pylori* in developing countries. *World Gastroenterol Organizat Global Guideline*. 1–15.

161. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. **(2002)**Phosphatidylserine–dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*. 109:41–50.

162. Iankov ID, Haralambieva IH, Galanis E. **(2011)** Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Vaccine.* 29: 1710–1720.

163. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **(1994)** Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori.IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.*61: 1–241.

164. Ihan A, Gubina M. **(2014)**The immune response to *Helicobacter pylori.Food Technol Biotechnol.* 52: 204–209.

165. Ilver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P, Telford JL. **(2004)** *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism*. Cell. Microbiol*. 6**:**167-*174.*

166. Ilver DA, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. **(1998)** *Helicobacter pylori*adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* 279: 373-377.

167. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae, Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. **(2011)** BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem*. 286: 25256–25264.

168. Ismail S, Mark B, Hampton B, Keenan JI. **(2003)** *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect Imm*. 71: 5670–5675.

169. Iwai H, Kim M, Yoshikawa Y, Ashida H, Ogawa M, Fujita Y, Muller D, Kirikae T, Jackson PK, Kotani S, Sasakawa C. **(2007)** A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell*. 130: 611-623.

170. Jacobson MD.**(1996)** Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends BiochemSci.* 21: 83-86.

171. Jarosińska A, Chmiela M, Ławnik M. **(1999)**Znaczenie reakcji krzyżowych w diagnostyce zakażeń *H. pylori. Konferencja. Biologia Molekularna w Diagnostyce Chorób Zakaźnych i Biotechnologii. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.* 169-173.

172. Jaworski W. **(1889)** Podręcznik Chorób żołądka. *Wydawnictwa Dzieł Lekarskich Polskich.* 32.

173. Jeremy AH, Du Y, Dixon MF, Robinson PA, Crabtree JE. **(2006)** Protection against *Helicobacter pylor*i infection in the Mongolian gerbil after prophylactic vaccination. *Microbes Infect.* 8:340–346.

174. Ji X, Fernandez T, Burroni D, Pagliaccia C, Atherton JC, Reyrat JM, Rappuoli R, Telford JL. **(2000)** Cell specificity of *Helicobacter pylori*cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect Immun.* 68: 3754-3757.

175. Jiang X, Doyle MP. **(1998)** *Effect of environmental and substrate factors on survival and growth of Helicobacter pylori. J Food Prot.* 8: 929-33.

176. Jiang X, Wang X. **(2004)** Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.*73: 87-106.

177. Jones NL, Day AS, Jennings HA, Sherman PM. **(1999)** *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infect Immun*. 67: 4237-4242.

178. Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ, Van Vliet AH, Kusters JG. **(2004)** Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J Me Microbiol*. 53: 375-379.

179. Jovanovic I,Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie ANJ,Arsenijevic N, Jonjic D, LukicML .**(2011)** ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol.* 41: 1902-1912.

180. Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. **(1997)** *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. *J Gastroenterol Hepatol.*12: 473-480.

181. Kaebisch R, Mejías-Luque R, Prinz C, Gerhard M. **(2014)** *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3. *J Immunol*. 192: 316-323.

182. Kansau I, Guillain F, Thiberge JM, Labigne A. **(1996)** Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the Helicobacter pylori GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol.* 22: 1013-1023.

183. Kansau I, Labigne A. **(1996)** Heat shock proteins of *Helicobacter pylori.Aliment Pharmacol Ther.* 1: 51-56.

184. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. **(2016)** *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*. 19:14–23.

185. Karczewska E, Wojtas I, Budak A. **(2009)** Występowanie pierwotnej oporności*Helicobacter pylori* na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie. *Post. Mikrobiol.* 48:31-41.

186. Kaur N, Dhiman M, Perez-Polo JR, Mantha AK. **(2015)** Ginkgolide B revamps neuroprotective role of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and mitochondrial oxidative phosphorylation against Aβ25–35-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *J Neuroscien Res.* 93: 938–947.

187. Kawahara Y, Yokota K, Mizuno M, Yunoki N, Uesu T, Okada H, Kobayashi K, Hirai Y, Oguma K, Tsuji T. **(1999)** Antibodies to human gastric epithelial cells and heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Gut*. 45: 20–23.

188. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. **(1999)** Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med.* 189: 1451-1460.

189. Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM, Murray PG, Kelly CP. **(1999)** Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag*+ and *cag*− *Helicobacter pylori*. *J Immunol.* 163: 5552-5559.

190. Kenny DT, Skoog EC, Lindén SK, Struwe WB, Rudd PM, Karlsson NG. **(2012)** Presence of terminal N-acetylgalactosamineβ1- 4N-acetylglucosamine residues on O-linked oligosaccharides from gastric MUC5AC: involvement in *Helicobacter pylori* colonization? *Glycobiology.* 22: 1077-1085.

191. Kidd M, Modlin IM. **(1998)** A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion.* 59: 1-15.

192. Kim S, Chamberlain AK, Bowie JU. **(2004)** Membrane channel structure of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin: role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:5988-5991.

193. Kliche K, Jeggle P, Pavenstädt H, Oberleithner H. **(2011)** Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflugers Arch*.462:209-217.

194. Konieczna I, Żarnowiec P, Kwinkowski M, Koloesińska B, Frączyk J, Kamiński Z, Kaca W. **(2012)** Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases.*Curr Prot Pep Sci*. 13: 789-806.

195. Kono H, Rock KL. **(2008)** How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 8: 279-298.

196. Kono H, Chen CJ, Ontiveros F. **(2010)** Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest.* 120:1939–1949.

197. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. **(2009)** IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*. 27: 485-517.

198. Kottakis F, Papadopoulos G, Pappa EV, Cordopatis P, Pentas S, Choli-Papadopoulou T. **(2007)** *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein activates neutrophils by its C-terminal region even without dodecamer formation, chich is a prerequisite for DNA protection – novel approaches against *Helicobacter pylori i*nflammation*. FEBS.* 275: 302–317.

199. Kranzer K, Eckhardt A, Aigner M, Knoll G, Deml L, Speth C, Lehn N, Rehli M, Schneider-Brachert W. **(2004)** Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 72: 4416-4423.

200. Krogfelt KA, Lehours P, Megraud F. **(2005)** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection*. Helicobacter.* 10: 5-13.

201. Kronsteiner B, Bassaganya-Riera J, Philipson C, Viladomiu M, Carbo A, Pedragosa M, Vento S, Hontecillas R. **(2013)** *Helicobacter pylori* infection in a guinea pig model is dominated by Th1 and cytotoxic CD8+ T cell responses. *Infect Immun*. 81: 3803-3813.

202. Krzysiek-Maczka G, Targosz A, Ptak-Belowska A, Korbut E, Szczyrk U, Strzalka M, Brzozowski T. **(2013)** Molecular alterations in fibroblasts exposed to *Helicobacter pylori:* a missing link in bacterial inflammation progressing into gastric carcinogenesis? *J Physiol Pharmacol.* 64: 77-87.

203. Krzywicka A. **(2010)** Testy nieinwazyjne w diagnostyce zakażeń *Helicobacter pylori. Prob Med Rodz.* 3: 39-42.

204. Kuck DB, Kolmerer C, Iking-Konert PH, Krammer W, Rudi J. (2001). Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun.* 69: 5080-5087.

205. Kurashima Y, Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Higashi H, Azuma T, Kondo S, Hatakeyama M. **(2008)** Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA multimerization sequence. *Int J Cancer.* 122: 823–831.

206. Kurowska–Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. **(2009)** IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages thatcontribute to airway inflammation. *J Immunol.* 183: 6469-6477.

207. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. **(2008)** Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*. 135: 41-60.

208. Lambert JR, Midolo P. **(1997)** The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 11: 7-33.

209. Le H, Wonyoung K, Juyang K, Hong R, Byungsuk K. **(2013)** Interleuki-33: a mediator of inflammation targeting hematopoietic stem and progenitor cellsand their progenies. *Front Immunol*. 4: 104.

210. Lee A, O'Rourke J, Corazon de Ungria M, Robertson B, Daskalopoulos Dixon MF. **(1997)** A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterolgy.*112: 1386–1397.

211. Lee HJ, Ock CHY, Kim SJ, Hahn KB. **(2010)** Heat shock protein: hard worker or bad offender for gastric diseases. *Int J Proteomics*. 2010:259163.

212. Lee JH, Jun SH, Kim J, Baik SC, Lee JC. **(2015)** Morphological changes in human gastric epithelial cells induced by nuclear targeting of *Helicobacter pylori* urease subunitA. *Microbiol.* 53: 406–414.

213. Lepper PM, Möricke A, Vogt K, Bode G, Trautmann M. **(2004)** Comparison of different criteria for interpretation of immunoglobulin G immunoblotting results for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 569–576.

214. Levin DA, Watermeyer G, Mohamed N, Epstein DP, Hlatshwayo SJ, Metz DC. **(2007)** Evaluation of a locally preduced rapid test for the diagnosis *of Helicobacter pylori i*nfection*. South African Medical Journal.* 97: 1281-1284.

215. Li H, Xu H, Sun B. **(2012)** Lipopolysaccharide regulates MMP-9 expression through TLR4/NF-κB signaling in human arterial smooth muscle cells. *Mol Med Rep*. 6:774–778.

216. Li SL, Zhao JR, Ren XY, Xie JP, Ma QZ, Rong QH. **(2013)** Increased expression of matrix metalloproteinase-9 associated with gastric ulcer recurrence. *World J Gastroenterol.* 19: 4590-4595.

217. Lin WC, Tsai HF, Liao HJ, Tang CH, Wu YY, HsuPI. **(2014)** *Helicobacter pylori* sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP. Cell *Death Dis.* p:1109.

218. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. **(2008)** Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 1: 183–197.

219. Lindén SK, Wickström C, Lindell G, Gilshenan K, Carlstedt I. **(2008)** Four modes of adhesion are used during *Helicobacter pylori* binding to human mucins in the oral and gastric niches. *Helicobacter*. 13:81–93.

220. Lindén SK, Sheng YH, Every AL, Miles KM, Skoog EC, Florin TH, Sutton P, McGuckin MA. **(2009)** MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS Pathog*. 5: e1000617.

221. Lindholm C, Quiding-Järbrink M, Lönroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. **(1998)** Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun*. 66: 5964-5971.

222. Linpisarn S, Koosirirat C, Prommuangyong K, Suwan W, Lertprasertsuke N, Phornphutkul K. **(2005)** Use of different PCR primers and gastric biopsy tissue from CLO test for the detection of *Helicobacter pylori. South Asian J Trop Med Pub Heal*. 36: 135-140.

223. Liou GY, Storz P. **(2010)** Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Res.* 44:479–496.

224. Logan RP. **(1998)** Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection*. Gut.* 43: S47-S50.

225. Logan SM, Trust TJ. **(1983)** Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*. 42: 675-682.

226. Lopetuso H, Scaldaferri F,Pizarroet TT. **(2012)** Emerging role of the interleukin (IL)-23/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogens Tiss Rep.* 5: 18-29.

227. Lopez-Casado MA, Lorite P, Palomeque T, Torres MI. **(2015)** Potential role of the IL-33/ST2 axis in celiac disease. *Cell Mol Immunol*. 1: 282-285.

228. Lott JM, Sumpter TL, Turnquist HR. **(2015)** New dog and newtricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J Leukoc Biol*. 97: 1037-1048.

229. Lu H, Murata-Kamiya N, Saito Y, Hatakeyama M. **(2009)** Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. *J Biol Chem.* 284: 23024-23036.

230. Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. **(2005)** Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor a and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis.* 26: 631–636.

231. Lucas R, Verin AD, Black SM, Catravas JD. **(2009)** Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochem Pharmacol*. 77: 1763-1772.

232. Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, Dallai R, Rappuoli R, Telford JL. **(1996)** Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol.* 133: 801-807.

233. Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, Shirator Y, Omata M. **(2001)** Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem.* 276: 44856-44864.

234. Magalhães A, Reis CA. **(2010)***Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. *Braz J Med Biol Res*. 43:611–618.

235. Magalhães A, Rossez Y, Robbe-Masselot C, Maes E, Gomes J, Shevtsova A, Bugaytsova J, Borén T, Reis CA. **(2016)** Muc5ac gastric mucin glycosylation is shaped by FUT2 activity and functionally impacts *Helicobacter pylori* binding. *Sci Rep.* 6: 25575.

236. Mahdavi JB, Sonde M, Hurtig FO, Olfat L, Forsberg N, Roche J, Angstrom, Larsson S, Teneberg KA, Karlsson S, Altraja T, Wadstrom D, Kersulyte, DE, Berg A. Dubois C, Petersson KE, Magnusson T, Norberg F, Lindh BB, Lundskog A, Arnqvist L, Boren T. **(2002)** *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science.*297: 573-578.

237. Malaty HM, Graham DY. **(1994)**Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 35: 742-745.

238. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytget G**. (2002)** Current concept in the management of*H. pylori* infection – the Maastricht 2-2002 consensus report. *Ali Pharmacol Therap*. 16: 167-180.

239. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. **(2007)***Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection*. *Gut*. 56: 772-781.

240. Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, Kaufmann SH, Ulrichs T, Novicki D, Norelli F, Contorni M, Peppoloni S, Berti D. **(2008)** Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology.* 135: 787–795.

241. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axonnn AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert J, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. **(2012)** Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*. 61: 646-664.

242. Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. **(1995)** Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*. 267: 1655-1658.

243. Marcos NT, Magalhães A, Ferreira B, Oliveira MJ, Carvalho AS, Mendes N, Gilmartin T, Head SR, Figueiredo C, David L. **(2008)** *Helicobacter pylori* induces β3GnT5 in human gastric cell lines; modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis X. *J Clin Investig.*118: 2325–2336.

244. Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y**. (2017)** *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*. 9: 101.

245. Matsuyama N, Kirikae T, Kirikae F, Hashimoto M, Amano K, Hayashi S, Hirai Y, Kubota T, Nakano M. **(2001)** Non-standard biological activities of lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 50: 865-869.

246. Matusiak A. **(2011)** Wyznaczniki odpowiedzi humoralnej i reakcji zapalnej w chorobie niedokrwiennej serca z towarzyszącym zakażeniem *Helicobacter pylori* (rozprawa doktorska). Uniwersytet Łódzki, Łódź.

247. Matusiak A, Chałubiński M, Broncel M, Rechciński T, Rudnicka K, Miszczyk E, Walencka M, Strapagiel D, Gajewski A, Chmiela M. **(2016)** Putative consequences of exposure to *Helicobacter pylori* infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation. *Arch Med Sci*. 12: 45-54.

248. Megraud F. **(1995)** Rationale for the choice of antibiotics for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 7:S49-S54.

249. Megraud F, Lamouliatte H. **(2003)** Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 17:1333-1343.

250. Megraud F. **(2004)** Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Drugs.* 64: 1893-1904.

251. Melchers K, Weitzenegger T, Buhmann A, Steinhilber W, Sachs G, Schäfer KP. **(1996)** Cloning and membrane topology of a P type ATPase from *Helicobacter pylori.J Biol Chem.* 271: 446-457.

252. Millar NL, O'Donnell CH, McInnes IB, Brint E. **(2017)** The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 61: 41-50.

253. Miller AM. **(2011)** Role of IL-33 in inflammation and disease*. J Inflamm.* 8: 22.

254. Mimuro H, Suzuki T, Nagai S, Rieder G, Suzuki M, Nagai T, Fujita Y, Nagamatsu K, Ishijima N, Koyasu S, Haas R, Sasakawa C. **(2007)** *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe.* 2: 250-263.

255. Miszczyk E, Rudnicka K, Moran AP, Fol M, Kowalewicz-Kulbat M, Druszczyńska M, Matusiak A, Walencka M, Rudnicka W, Chmiela M. **(2012)** Interaction of *Helicobacter pylori* with C-type lectin dendritic cell-specific ICAM grabbing nonintegrin. *J Biomed Biotechnol*. 2012: 206463.

256. Miszczyk E, Walencka M, Chmiela M. **(2014)** Modele zwierzęce w badaniach nad przebiegiem zakażeń *Helicobacter pylori. Post Hig Med Dośw*. 68: 603-615.

257. Miszczyk E,Walencka M, Rudnicka K, Matusiak A, Rudnicka W, Chmiela M. **(2014a)** Antigen-specific lymphocyte as a marker of immune response in guinea pigs with sustained *Helicobacter pylori* infection. *Acta Biochim Pol*. 61: 295-303.

258. Mnich E, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Hinc K, Obuchowski M, Gajewski A, Moran AP, Chmiela M. **(2016)** Impact of *Helicobacter pylori* on the healing process of the gastric barrier. *World J Gastroenterol.*22:7536–7558.

259. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. **(1995)** Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*. 59: 451-480.

260. Modlin I. **(1990)** From Prout to the Proton Pump: A history of the Science of Gastric Acid Secretion and the Surgery of Peptic Ulcer. *SG&O*. 170: 81–96.

261. Montecucco C. **(1998)** The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem Biophys Res Commun.* 248: 334-340.

262. Montecucco C. **(2002)** Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*. *J Mol Biol.*323:125–130.

263. Montecucco, C, de Bernard M. **(2003)** Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect.* 5:715-721.

264. Monteiro L, Birac C, Megraud F. **(1997)** Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biosy by polimerase chain reaction (PCR*).FEMS Immu Med Microbiol*. 24: 112-119.

265. Monteiro MA, Chan KH, Rasko DA, Taylor DE, Zheng PY, Appelmelk B J, Wirth HP, Yang M, Blaser MJ, Hynes SO, Moran AP, Perry MB. **(1998)** Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between H. pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem*. 273:11533-11543.

266. Monteiro MA, Zheng P, Ho B, Yokota S, Amano K, Pan Z, Berg DE, Chan KH, MacLean LL, Perry MB. **(2000)** Expression of histoblood group antigens by lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group a antigens. *Glycobiology.* 10: 701-713.

267. Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, Del Giudice G, Rappuoli R, Colucci M, De Rinaldis P, Montecucco C, Semeraro N, Papini E. **(2001)** *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis.* 183: 1055–1062.

268. Montemurro P, Nishioka H, Dundon WG, de Bernard M, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. **(2002)** The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells. *Eur J Immunol*. 32:671–676.

269. Moore KL, Dalley AF, Agur A, Moore MR. **(2015)** Anatomia kliniczna. Tom 2, Wyd. 1 polskie, przeł. Janusz Moryś, Wrocław 2015, MedPharm Polska.

270. Moran AP, Helander IM, Kosunen TU. **(1992)** Compositional analysis of *Helicobacter* pylori rough-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol.* 174: 1370-1377.

271. Moran AP, Aspinall GO. **(1998)** Unique structural and biological features of *Helicobacter* pylori lipopolysaccharides. *Prognos Clin Biol Res.* 397: 37-49.

272. Moran AP, Svennerholm A, Penn ChW. **(2002)**Pathogenesis and host response of *Helicobacter pylori*.*Trends Microbiol.* 10: 545-547.

273. Moran AP, Gupta A, Joshi L. **(2011)** Sweet talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal track. *Gut*. 60: 1412–1425.

274. Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Yamamoto N. **(2003)** *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB.*Gastroenterology.* 124:983-992.

275. Morton HC, Egmond M, Winkel JG. **(1996)** Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev Immunol*. 16: 423-440.

276. Muotiala A, Helander IM, Phyälä L, Kosunen TU, Moran AP. **(1992)** Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 60: 1714-1716.

277. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM, Azuma T. **(2007)***Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene.* 26:4617–4626.

278. Nagata K, Yu H, Nishikawa M, Kashiba M, Nakamura A, Sato EF, Tamura T, Inoue M. **(1998)** *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J Biol Chem.* 273:14071-14073.

279. Nakagawa S, Osaki T, Fujioka Y, Yamaguchi H, Kamiya S. **(2005)** Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori:* microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 12:347–353.

280. Naughton JA, Mariño K, Dolan B, Reid C, Gough R, Gallagher ME, Kilcoyne M, Gerlach JQ, Joshi L, Rudd P, Carrington S, Bourke B, Clyne M. **(2013)** Divergent mechanisms of int*eraction of Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* with mucus and mucins. *Infect Immun*. 81: 2838-2850.

281. Navabi N, Johansson MEV, Raghavan S, Lindén SK. **(2013)** *Helicobacter pylori* infection impairs the mucin production rate and turnover in the murine gastric mucosa. *Infect Immun*. 81:829–837.

282. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, Solcia E. **(2007)** Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.*132: 1009-1023.

283. Negrate G, Le V, Ricci V, Hofman B, Mograbi P, Ross**i** B. **(2001)** Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the cag pathogenicity Island phenotype**.** *Infect Immun.*69: 5001-5009.

284. Negrini R, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Gullini S, Villanacci V, Poiesi C, Albertini A, Ghielmi S. **(1991)** *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology*. 101: 437-445.

285. Negrini R, Savio A, Poiesi C, Appelmelk BJ, Buffoli F, Paterlini A, Cesari P, Graffeo M, Vaira D, Franzin G. **(1996)** Antigenic mimicry between *Helicobacter pylori* and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology.* 111: 655-665.

286. Negrini R, Savio A, Appelmelk BJ. **(1997)**Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.*2: S13-S16.

287. Nešić D1, Buti L, Lu X, Stebbins CE. **(2014)** Structure of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein bound to the human tumor suppressor ASPP2.*Proc Natl Acad Sci USA.*111: 1562-1567.

288. Neu B, Randlkofer P, Neuhofer M, Voland P, Mayerhofer A, Gerhard M, Schepp W, Prinz C. **(2002)** *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am. J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 283:G309-G318.

289. Ng EK, Thompson SA, Pérez-Pérez GI, Kansau I, van der Ende A, Labigne A, Sung JJ, Chung SC, Blaser MJ. **(1999)** *Helicobacter pylori* heat shock protein A: serologic responses and genetic diversity. *Clin Diagn Lab Immunol.*6: 377-382.

290. Nikoronow E, Godlewska R, Jagustyn-Krynicka EK. **(2008)** Oddziaływanie *Helicobacter pylori* na komórki systemu odporności wrodzonej. *Post Mikrobiol.* 47: 137-148.

291. Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Giudice G, Montecucco C. **(2003)** The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. *Eur J Immunol*. 33: 840-849.

292. Niv Y, Boltin B, Halpern M, Cohen M, Levi Z, Vilkin A, Morgenstern S, Manugian V, St Lawrence E, Gagneux P, Kaur S, Sharma P, Batra SK, Ho SB. **(2014)** Membranebound mucins and mucin terminal glycans expression in idiopathic or *Helicobacter pylori,* NSAID associated peptic ulcers. *World J Gastroenterol*. 20:14913–14920.

293. Noshiro M, Kusugami K, Sakai T, Imada A, Ando TK. **(2000)** Gastric metaplasia in the duodenal bulb shows increased mucosal interleukin-8 activity in *Helicobacter pylori*-positive duodenal ulcer patients. *Scand. J. Gastroenterol*. 35: 482–489.

294. Noto J, Peek R. **(2015)** Sound the alarmin: interleukin-33 commanders the gastric immune response. *Cell Mol Gastroenterol Hep.* 1: 127- 128.

295. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S. **(2010)** IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int*. 59: 143–160.

296. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. **(2010a)** IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 18581–18586.

297. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B , Gerland E, Fischer W, Haas R. **(2000)**Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IVsecretion.*Science.* 287: 1497-1500.

298. Ogura KS, Maeda M, Nakao T, Watanabe M, Tada T, Kyutoku H, Yoshida Y, Shiratori Omata M. **(2000)** Virulence factors of Helicobacter pylori responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med*. 192: 1601-1610.

299. Oldstone MB. **(1989)** Molecular mimicry as a mechanism for the cause and a probe uncovering etiologic agent(s) of autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 145: 127-135.

300. Olivares D, Gisbert JP, Pajares JM. **(2005)***Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 97: 505-520.

301. Oliveira MJ, Costa AC, Costa AM, Henriques L, Suriano G, Atherton JC. **(2000)** *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. *J Biol Chem.* 281: 34888-34896.

302. Olivera-Severo D, Wassermann GE, Carlini CR. **(2006)** Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz. J Med Biol Res*. 39: 851-861.

303. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. **(1999)** Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19: 1279-1288.

304. Palizban A, Saghaie L. **(2016)** Synthesis and evaluation of the complex-forming ability of hydroxypyranones and hydroxypyridinones with Ni (II) as possible inhibitors for urease enzyme in*Helicobacter pylori.Res PharmSci.* 11: 332-342.

305. Park IS, Michel LO, Pearson MA, Jabri E, Karplus PA, Wang S, Dong J, Scott RA, Koehler BP, Johnson MK, Hausinger RP. **(1996)** Characterization of the mononickel netallocenter in H134A mutant urease. *J Biol Chem*. **2**: 18632-18637.

306. Park JS, Yeom JS, Seo JH, Lim JY, Park CH, Woo HO, Youn HS, Jun JS, Park JH, Ko GH, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH. **(2015)** Immunohistochemical expressions of MUC2, MUC5AC, and MUC6 innormal, *Helicobacter pylori* infected and metaplastic gastric mucosa of children and adolescents. *Helicobacter.* 204: 260-268.

307. Pastorelli L, De Salvo C, Veccni M, Pizarro TT. **(2013)** The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. *Mediators Inflamm*. 4: 280.

308. Pautahidis T, Tsangaris T, Kanakoudis G, Vlemmas I, Iliadis N, Sofianou D. **(2001)***Helicobacter pylori*-induced gastritis in experimentally infected conventional piglets. *Vet. Pathol.* 38: 667-678.

309. Paziak-Domańska B, Chmiela M, Jarosinska A, Rudnicka W. **(2000)** Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell Immunol*. 202:136–139.

310. Peek RM,Blaser MJ. **(2002)** *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2: 28-37.

311. Perez-Perez, GI, Rothenbacher D, Brenner H. **(2004)** Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 9: 1-6.

312. Perfetto B, Buommino E, Canozo N, Paoletti I, Corrado F, Greco R, Donnarumma G. **(2004)** Interferon-gamma cooperates with *Helicobacter pylori* to induce iNOS-related apoptosis in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Res Microbiol*. 4:259–266.

313. Perrais M, Rousseaux C, Ducourouble MP, Courcol R, Vincent P, Jonckheere N, Van Seuningen I. **(2014)** *Helicobacter pylori* urease and flagellin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells. *Gastric Cancer*. 17:235–246.

314. Perri FV, Festa R, Clemente M, Quitadamo, Andriulli A. **(2000)** Rifabutin-based 'rescue therapy' for *Helicobacter pylori* infected patients after failure of standard regimens. *Aliment Pharmacol Ther*. 14:311-316.

315. Perschinka H, Wellenzohn B, Parson W, van der Zee R, Willeit J, Kiechl S, Wick G. **(2005)** Identification of atherosclerosis-associated conformational heat shock protein 60 epitopes by phage display and structural alignmen. *Atherosclerosis.* 194: 79–87.

316. Peterson WL, Graham DY, Marshall B, Blaser MJ, Genta RM, Klein PD, Stratton CW, Drnec J, Prokocimer P, Siepman N. **(1993)** Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori:* a randomized, double-blind trial. *Am J Gastroenterol.* 88:1860-1864.

317. Pierzchalski P, Pytko-Polonczyk J, Jaworek J, Konturek SJ, Gonciarz M. **(2009)**Only live *Helicobacter pylori* is capable of caspase-3 dependent apoptosis induction in gastric mucosa epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*. 60:119–128.

318. Polenghi A, Bossi F, Fischetti F, Durigutto P, Cabrelle A, Tamassia N, Cassatella MA, Montecucco C, Tedesco F, de Bernard M. **(2007)** The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion *in vivo. J Immunol.* 178:1312–1320.

319. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. **(2011)**The association between *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance: a systematic review. *Helicobacter.* 16: 79-88.

320. Portal-Celhay C, Perez-Peres GI. **(2006)** Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clin Sci.*110:305–314.

321. Qu Y, Oyan AM, Liu R. **(2013)** Generation of prostate tumor-initiating cells is associated with elevation of reactive oxygen species and IL-6/STAT3 signaling. *Cancer Res*. 73:7090–7100.

322. Quaratino S, Thorpe CJ, Travers PJ, Londei M. **(1995)** Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 10398-10402.

323. Rabczyński M, Adamiec R, Olszewska-Roczniak J. **(2006)** Przeciwciała anty-HSP 60/65 – rola w patogenezie miażdżycy, czynnik ryzyka rozwoju blaszki miażdżycowej. *Adv. Clin. Exp. Med.* 15: 933–939.

324. Raetz CR, Whitfield C. **(2002)** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 71: 635–700.

325. Ramarao N, Meyer TF. **(2004)** *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect Immun*. 69: 2604-2611.

326. Ramaro N, Meyer TF. **(2001)** *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect immune*. 69: 2604-2611.

327. Rassow J, Meinecke M. **(2012)** *Helicobacter pylori* VacA: a new perspective on an invasive chloride channe*. Microbes Infect.*14: 1026-1033.

328. Rautelin HI, Oksanen AM, Veijola LI, Sipponen PI, Tervahartiala TI, Sorsa TA, Lauhio A. **(2009)** Enhanced systemic matrix metalloproteinase response in *Helicobacter pylori* gastritis. *Ann Med.* 41: 208-215.

329. Rechciński T, Chmiala M, Małecka-Panas E, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W. **(1997)**Serological indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. *Microbiol Immunol*. 41:387-393.

330. Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, Crippa A, Moura CM, Adonias SP, Srougi M, Dall'Oglio MF. **(2012)** Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urol.* 12:18.

331. Rock KL, Lai JJ, Kono H. **(2011)** Innate and adaptive immune responses to cell health. *Immunol Rev.*243:191–205.

332. Rosemary CS, Andrew RW, Christine ML. **(2009)** Evaluation of *Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM serologic testing compared to stool antigen testing. *Clin. Vaccine Immunol*. 16: 1253–1255.

333. Rossi G, Ruggiero P, Peppoloni S, Pancotto L, Fortuna D, Lauretti L, Volpini G, Mancianti S, Corazza M, Taccini E. **(2004)** Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect Immun*. 72:3252–3259.

334. Rožanković PB, Huzjan AL, Cupić H, Benčić IJ, Bašić S, Demarin V. **(2011)** Influence of CagA-positive *Helicobacter pylori* strainson atherosclerotic carotid disease. *J Neurol.* 258: 753-761.

335. Rudi J, Kuck D, Strand S, Von Herbay A, Mariani SM, Krammer PH. **(1998)** Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest.* 102: 1506-1514.

336. Rudnicka K, Grebowska A, Moran AP, Matusiak A, Walencka M, Miszczyk E, Bąk-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W, Chmiela M. **(2011)** Different effectiveness of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides with or without LewisXY determinants in stimulating the

secretion of proinflammatory cytokines IL-8 and TNF-α by peripheral blood mononuclear leukocytes. *Przeg Gastroenterol.* 6: 401-408.

337. Rudnicka K, Włodarczyk M, Moran AP, Rechciński T, Mszczyk E, Matusiak A, Szczęsna E, Walencka M, Rudnicka W, Chmiela M. **(2012)** *Helicobacter pylori* antigens as potential modulators of lymphocytes cytotoxic activity. *Microbiol Immu.* 56: 62-75.

338. Rudnicka K, Matusiak A, Miszczyk E, Rudnicka W, Tenderenda M, Chmiela M. **(2013)** Immunophenotype of peripheral blood natural killer cells and IL-10 serum levels in relation *H. pylori* LPS. *Inn Immu.*121: 806-813.

339. Rudnicka K, Backert S, Chmiela M. **(2019)** Genetic polymorphisms in inflammatory and other regulators in gastric cancer: risks and clinical consequences. *Curr Top Microbiol Immunol*. 421:53-76.

340. Rudnicka K., Graczykowski M., Tenderenda M., Chmiela M. **(2014)**Formy morfologiczne *Helicobacter pylori*i ich przypuszczalna rola w transmisji zakażeń. *Post Hig MedDośw.* 68: 227-237.

341. Rudnicka W, Czkwianianc E, Płaneta-Małecka I, Jurkiewicz M, Wiśniewska M, Cieslikowski T, Różalska B, Wadström T, Chmiela M. **(2001)**A potential double role of anti-Lewis X antibodies in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *FEMS Immunol Microbiol*. 30:121–125.

342. Rudnicka W, Jarosinska A, Bak-Romaniszyn L, Moran A, Planeta-Malecka I, Wadstrom T, Chmiela M. **(2003)***Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in the IL-2 milieu activates lymphocytes from dyspeptic children. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 36: 141-145.

343. Ruiz B, Rood E, Fontham TH, Malcom GT, Hunter FM, Sobhan M, Johnson WD, Correa P. **(1994)** Vitamin C concentration in gastric juice before and after anti-*Helicobacter pylori* treatment*. Am J Gastroenterol.* 89:533-539.

344. Rybicka M, Stalke P, Bielawski KP, Nakonieczna J. **(2010)** Zakażenia bakteriami rodzaju *Helicobacter* spp. w przewlekłym uszkodzeniu wątroby.*Post Hig Med Dośw.* 64: 386-395.

345. Ryu KH, Yi SY, Na YJ, Baik SJ, Yoon SJ, Jung H, Song HJ. **(2010)** Reinfection rate and endoscopic changes after successful eradication of *Helicobacter pylori.World J Gastroenterol.* 16: 251-255.

346. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. **(2007)** *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/ MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature.* 447: 330-333

347. Saberi S, Douraghi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Zeraati H, Hosseini ME, Mohagheghi MA, Parsaeian M, Mohammadi M. **(2012)** A potential association between *Helicobacter pylori* CagA EPIYA and multimerization motifswith cytokeratin 18 cleavage rate during early apoptosis. *Helicobacter.* 17: 350-357.

348. Sanaka MY, Kuyama M, Yamanaka M, Iwasaki I. **(1999)** Decrease in serum concentrations of *Helicobacter pylori* IgG antibodies during antituberculosis therapy: the possible eradication by rifampicin and streptomycin. *Am J Gastroenterol.* 94: 1983-1984.

349. Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V. **(2000)** The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med*.191: 1467–1476.

350. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, Eck M. **(2004)** Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.* 136: 521-526.

351. Schoep TD, Fulurija A, Good F, Lu W, Himbeck RP, Schwan C, Choi SS, Berg DE, Mittl PRE, Benghezal M, Marshall BJ. **(2010)** Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. *PLoS ONE*. 5: e15042.

352. Schreiber S, Bücker R, Groll C, Azevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, Friedrich S, Gatermann S, Josenhans C, Suerbaum S. **(2005)** Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. *Infect Immun.* 73: 1584-1589.

353. Schwartz JT, Allen LAH. **(2006)** Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *J Leukoc Biol*. 79: 1214-1225.

354. Schwartz M. **(1960)**Intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia. *Lancet.*2: 1263-1267.

355. Schwarzer A, Lottspeich C, Russmann H, Ossiander G, Koletzko S. **(2007)**Evaluationof a novel rapid one-step monoclonal chromatographic immunoassayfor detection of *Helicobacter pylori* in stool fromchildren. *Europ J Clin Microbiol Infect. Dis.* 26:475-480.

356. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. **(2002)** Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori. Gastroenterology.* 123:187-195.

357. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K. **(200)** Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem*. 267: 3032–3039.

358. Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, Bassetto F, Doria A. **(2010)** Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J Leukoc Biol.* 87: 385-395.

359. Shahrizaila N, Yuki N. **(2011)** Guillain-barré syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder.*J Biomed Biotechnol.*2011: 829129.

360. Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR**. (2006)** Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci*. 119: 2095-2106.

361. Shi Y, Evans JE, Rock KL. **(2003)** Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 425: 516-521.

362. Shibata J, Goto H, Arisawa T, Niwa Y, Hayakawa T, Nakayama A, Mori N. **(1999)** Regulation of tumor necrosis factor (TNF) induced apoptosis by soluble TNF receptors in *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 45: 24-31.

363. Simoons-Smit IM, Appelmelk BJ, Verboom T, Negrini R, Penner JL, Aspinall GO, Moran AP, Fei SF, Shi BS, Rudnicka W, Savio A, de Graaff J. **(1996)** Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol.* 34: 2196-2200.

364. Sjoerdn G, Zarmina R, Gary D, Beavan JR, Gibson LJ, Owen R. **(2001)** Analysis of host responses of guinea pigs during *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 30:151–156.

365. Sjunnesson H, Sturegard E, Hynes S, Willén R, Feinstein R, Wadström T. **(2003)** Five month persistence of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs. *APMIS*. 111: 634-642.

366. Skirrow MB. **(1977)** *Campylobacter enteritis:* a "new" disease. *Br Med. J*. 2:9-11.

367. Skoog EC, Sjöling Ä, Navabi N, Holgersson J, Lundin SB, Lindén SK. **(2012)** Human gastric mucins differently regulate *Helicobacter pylori* proliferation, gene expression and interactions with host cells. *PLoS One*. 7:e36378.

368. Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. **(1999)** Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: down-regulation of nitric oxide synthase-2 and caspase-3 by sulglycotide. *Bioch Biophys Res Commun*. 61:15–20.

369. Sharma SA, Murali KR, Geraldine T,Miller G, Blaser MJ. **(1995)** Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. *Infect Imm*. 5: 1681–1687.

370. Smith GV, Moran AP, Bajaj-Elliott M, Farthing MJ. **(2003)** Induction of cyclooxygenase 2 by *Escherichia coli* but not *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in gastric epithelial cells *in vitro*. *Helicobacter.* 8: 513–520.

371. Smith MF, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB**. (2003)** Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5 but not TLR4, are required for *H. pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Bioch Chem.* 278: 32552-32560.

372. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. **(1997)** Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol*. 51:317–322.

373. Smoot DT, Elliott, TB, Verspaget HW, Jones D, Allen CR, Vernon KG, Bremner T, Kidd LC, Kim KS, Groupman JD, Ashktorab H. **(2000)** Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis*. 21:2091-2095.

374. Stasi R, Provan D. **(2008)** *Helicobacter pylori* and Chronic ITP. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 206-211.

375. Stawerska R, Czkwianianc E, Matusiak A, Smyczyńska J, Hilczer M, Chmiela M, Lewiński A. **(2015)** Prevalence of autoantibodies against some selected growth and appetite-regulating neuropeptides in serum of short children exposed to *Candida albicans* colonization and/or H*elicobacter pylori* infection: the molecular mimicry phenomenon. *Neuro Endocrinol Lett*. 36: 458-464.

376. Stern AR, Stern MM, Van Dyke ME, Jähn K, Prideaux M, Bonewald LF. **(2012)** Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *Biotechniques.* 52: 361–373.

377. Stole M, Meining A. **(2010)** The updated Sydney system: classification and trading as the basis od diagnosis and treatment. *Canadian J Gastroenterol.* 15: 594-586.

378. Strickland RG, Mackay IR. **(1973)** A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *Am J Dig Dis.* 18: 426-440.

379. Strömberg E, Lundgren A, Edebo A, Lundin S, Svennerholm AM, Lindholm C. **(2003)** Increased frequency of activated T-cells in the *Helicobacter pylori*-infected antrum and duodenum. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 36: 159-168.

380. Sturegard E, Sjunesson H, Ho B, Willen R, Aleljung P, Ng HC, Wadstrom T **(1998)** Severe gastritis in guinea pigs infected with *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 47: 1123–1129.

381. Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. **(2006)** Immune response to *H. pylori.World J Gastroenterol*. 12: 5593-5598.

382. Sun YQ, Soderholm JD, Petersson F, Borch K. **(2004)** Long-standing gastric mucosal barrier dysfunction in *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mongolian gerbils. *Helicobacter.* 9: 217–27.

383. Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL. **(2004)** Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci.* 101: 7727-7732.

384. Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, Okubo M, Zaitsu Y, Ariyoshi K, Nakamura Y, Nawata R, Oka Y, Shirai M, Tanizawa Y. (2004) Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori* associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 124: 91-96.

385. Tamer GS, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO**. (2009)** *Helicobacter pylori* seropositivity in patients with acute coronary syndromes. *Dig Dis Sci.* 54: 1253-1256.

386. Tan HJ, Goh KL. **(2012)** Extragastrointestinal manifestations of *Helicobacter pylori* infection: facts or myth? A critical review. *J Dig Dis*. 13: 342-349.

387. Tan MP, Pedersen J, Zhan Y, Lew AM, Pearse MJ, Wijburg OLC, Strugnell RA.**(2008)** $CD8^+$ T cells are associated with severe gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice in the absence of $CD4^+$ T Cells. *Infect Immun*. 76: 1289-1297.

388. Tan S, Tompkins LS, Amieva MR. **(2009)** *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog.* 5: e1000407.

389. Tanahashi T, Kita M, Kodama T, Yamaoka Y, Sawai N, Ohno T, Mitsufuji S, Wei YP, Kashima K, Imanishi J. **(2000)** Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect Immun.*68: 664-671.

390. Tarnawski A. **(1998)** Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair. In: Bioregulation and Its Disorders in Gastrointestinal Tract. *Ed. Blackwell Science.* Japan, Tokyo. 3-17.

391. Tarnawski AS, Ahluwalia A, Jones MK. **(2012)** The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target. *Curr Med Chem*. 19: 4-15.

392. Tavares R, Pathak SK. **(2015)** *Helicobacter pylori* protein JHP0290 exhibits proliferative and anti-apoptotic effects in gastric epithelial cells. *PLoS One*. 10: e0124407.

393. Taylor KB, Roitt IM, Doniach D, Couchman KG, Shapland C. **(1962)** Autoimmune phenomena in pernicious anaemia: gastric antibodies. *Br Med J.* 2: 1347-1352.

394. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z. **(1994)** Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 179: 1653-1658.

395. Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR **(2009)** The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. Antioxidants & redox signaling 11: 601–619.

396. Terano A, Ivey K.J, Stachura J, Sekhon S, Hosojima H, Mckenzie WN,, William J, Krause J, Wyche JH. **(1982)** Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology.* 83: 1280-91.

397. Thomas WD, Hersey P. **(1998)** TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol.* 161: 2195-2200.

398. Tiwari SK, G M, Khan AA, Habeeb A, Habibullah CM. **(2009)** Chronic idiopathic thrombocytopenia purpura and *Helicobacter pylori* eradication: A case study. *Gastroenterology.* 2: 57-59.

399. Tombola FC, CarlessoSzabo I, de Bernard M, Reyrat JM, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. **(1999)** *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys. J.* 76: 1401-1409.

400. Tonello F, Dundon WG, Satin B, Molinari M, Tognon G, Grandi G, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. **(1999)** The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol Microbiol*. 34: 238–246.

401. Tracey AM, Wen GJ. **(2008)** Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Bioch. Bioph. Acta.* 1788: 872-891.

402. Tsugawa H, Suzuki H, Satoh K, Hirata K, Matsuzaki J, Saito Y, Suematsu M, Hibi T. **(2011)** Two amino acids mutation of ferric uptake regulator determines *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole. *Antioxid Redox Signal*. 14: 15-23.

403. Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T. **(2012)** Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe.* 12: 764–777.

404. Uibo R, Vorobjova T, Metsküla K, Kisand K, Wadström T, Kivik T. **(1995)** Association of *Helicobacter pylori* and gastric autoimmunity: a population-based study. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 11: 65-68.

405. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. **(2005)** The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils*. J Biol. Chem.* 280: 15390-15397.

406. Unger Z, Molnár B, Szaleczky E, Törgyekes E, Müller F, Zágoni T, Tulassay Z, Prónai L. **(2001)** Effect of *Helicobacter pylori* infection and eradication on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis. *J Physiol Paris*. 95: 355–60.

407. Urban J. **(2010)** *Helicobacter pylori*– diagnostyka i leczenie.*Dent. Med. Prob.* 47: 487-495.

408. Urita Y, Hike K, Torii N, Kikuchi Y, Kurakata H, Kanda E, Sasajima M, Miki K. **(2004)** Comparison of serum IgA and IgG antibodies for detecting *Helicobacter pylori* infection. *Intern Med*. 43: 548-552.

409. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN. **(1999)** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. *Lancet.*354: 30-33.

410. Valko M, Morris H, Cronin MT. **(2005)** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12: 1161–208.

411. Van de Bovenkamp JH, Mahdavi J, Korteland-Van Male AM, Buller HA, Einerhand AW, Boren T, Dekker J. **(2003)** The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach*. Helicobacter.* 8: 521-532.

412. Van den Brink, GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. **(2000)** *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut.* 46: 601-607.

413. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG. **(1998)** Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2597-2603.

414. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Carona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiSdtefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. **(2004)** Nod1 responds to peptidoglycan delivered by *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 5: 1166-1174.

415. Viladomiu M, Bassaganya-Riera J, Tubau-Juni N, Kronsteiner B, Leber A, Philipson CW, Zoccoli-Rodriguez V, Hontecillas R. **(2017)** Cooperation of gastric mononuclear phagocytes with *Helicobacter pylori* during colonization. *J Immunol*. 198(8): 3195-3204.

416. Vogiatzi P, Cassone M, Luzzi I, Lucchetti C, Otvos L, Giordano A. **(2007)** *Helicobacter pylori* as a class I carcinogen: physiopathology and management strategies*. J Cell Biochem.* 102: 264-273.

417. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. **(1982)** Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 95: 355–360.

418. Walz A, Odenbreit S, Mahdavi J, Boren T, Ruhl S. **(2005)** Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology*. 15: 700-708.

419. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenberg P, Wagner H, Wessel K, Kirchner H, Hennig H. **(2000)** Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 55: 178-184.

420. Wang CA, Liu YC, Du SY, Lin CW, Fu HW. **(2008)** *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein promotes myeloperoxidase release from human neutrophils. *Bioch Biophys Res Commun.* 377: 52–56.

421. Wang HJ, Kuo CH, Yeh AA, Chang PC, Wang WC. **(1998)** Vacuolating toxin production in clinical isolates of *Helicobacter pylori* with different *vacA* genotypes. *J Infect. Dis.* 178: 207-212.

422. Wang J, Hori K, Ding J, Huang Y, Kwan P, Ladak A, Tredget EE. **(2011)** Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *J Cell Physiol*. 226: 1265-1273.

423. Wang KS, Frank DA, Ritz J. **(2000)** Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*. 95: 3183-3190.

424. Wang YH, Gorvel JP, Chu YT, Wu JJ, Lei HY. **(2010)** *Helicobacter pylori* impairs murine dendritic cell responses to infection. *PLoS One*. 27: e10844.

425. Wang X, Fan Lindholm C, Bennett M, O'Connoll J, Shanahan F. **(2000)** *Helicobacter pylori* modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas ligand interactions. *Infect Immun.* 68: 4303-4311.

426. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. **(2000)** Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology.* 118: 36-47.

427. Warren JR, Marshall B. **(1983)** Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. Lancet.* 1:1273-1275.

428. Wassermann GE, Olivera-Severo D, Uberti AF, Carlini CR. **(2010)** *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *J Cell Mol Med.* 14: 2025-2034.

429. Wessler S, Backert S. **(2008)** Molecular mechanisms of epithelialbarrier disruption by *Helicobacter pylori Trends Microbiol.* 16: 397-405.

430. Westphal O, Lüderitz O, Bister F. **(1952)** Über die extraktion von bakterien mit phenol-wasser. Z Naturforsch 78: 148-155.

431. Whitton JL, Feuer R. **(2004)** Myocarditis, microbes and autoimmunity. *Autoimmunity*.37(5): 375-386.

432. Wilson KT, Crabtree JE. **(2007)** Reviews in basic and clinical gastroenterology. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies**.** *Gastroenterology.* 133: 288-308.

433. Windle HJ, Fox A, Ní Eidhin D, Kelleher D. **(2000)** The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 275: 5081-5089.

434. Wirth HP, Yang M, Peek RM, Höök-Nikanne J, Fried M, Blaser MJ. **(1999)** Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same strain*. J Lab Clin Med.* 133: 488–500.

435. Wiśniewska M, Nilson HO, Bąk-Romaszyn L, Płaneta-Małecka I, Płaneta M, Konturech S, Wadstrom T, Rudnicka W, Chmiela M. **(2002)** Decection of specyfic *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stolol samales In dyspeptic patients and health subjects. *Microbiology and Immunology.* 46: 657-665.

436. Wroblewski LE, Shen L, Ogden S, Romero-Gallo J, Lapierre LA, Israel DA, Turner JR, Peek RM. **(2009)** *Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterology.* 136: 236-246.

437. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. **(2010)** *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 23: 713-739.

438. Wroblewski LE, Peek RM Jr. **(2011)** Targeted disruption of the epithelial barier by *Helicobacter pylori. Cell Commun Signal*. 9: 29.

439. Wu J, Lin K, Zeng J, Liu W, Yang F, Wang X, Xiao Y, Guo X, Nie H, Zhou T, Xu C. **(2014)** Role of DC-SIGN in *Helicobacter pylori* infection of gastrointestinal cells. *Front Biosci (Landmark Ed).*19: 825-34.

440. Wu YY, Tsai HF, Lin WC, Chou AH, Chen HT, Yang JC. **(2004)** *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 10: 2334-2339.

441. Wu YY, Tsai HF, Lin WC, Hsu PI, Shun CT, Wu MS. **(2007)** Upregulation of CCL20 and recruitment of CCR6 gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis. *Infect Immun.* 75: 4357-4363.

442. Xi YG, Ding KY, Ren YH, Shen Y, Ke Y. **(2002)** Esophageal cancer in Chinese population: no polymorphism in codon 149 of P21(Waf1/Cip1) cyclin dependent kinase gene. *Oncogene.* 21: 7745-7748.

443. Xia HH, Talley NJ. **(2001)** Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. 96: 16-26.

444. Xiang Z, Bugnoli M, Ponzetto A, Morgando A, Figura N, Covacci A, Petracca R, Pennatini C, Censini S, Armellini D. **(1993)** Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12: 739-745.

445. Xiao Q, Mandal K, Schett G, Mayr M, Wick G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Xu Q.**(2005)** Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in follow-up study. *Stroke.* 36: 2571–2576.

446. Xiao SD, Liu WZ, Xia DH, Jiang SJ, Wang RN, Zhang ZH, Xu WW. **(1990)** The efficacy of furazolidone and metronidazole in the treatment of chronic gastritis associated with *Helicobacter(Campylobacter) pylori*—a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Hepato-Gastroenterology.* 37: 503-506.

447. Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere Asim FIM, Yao MD, Potosky D, Meltzer SJ, Rhee JG, Kim SS, Moss SF, Hacker A, Wang Y, Casero R A, Wilson KT. **(2004)** Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 64: 8521-8525.

448. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY**. (2000)** A proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori. Proc Nat Acad Sci USA.* 97: 7533-7538.

449. Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. **(2003)** The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* 187:334-337.

450. Yan J, Mao YF, Shao ZX. **(2005)** Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World J Gastroenterol.* 11: 421–425.

451. Yang JCh, Chien CT. **(2011)** Oxidative stress involved autophagy and apoptosis in *Helicobacter pylori* related gastritis. *Gastritis and gastric cancer. IntechOpen*.

452. Yu J, Leung WK, Go MY, Chan MC, To KF, Ng EK, Chan FK, Ling TK, Chung SC, Sung JJ. **(2002)** Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut.* 51: 480-484.

453. Yuan SY, Rigor RR. **(2010)** Regulation of endothelial barrier function. in: integrated systems physiology: from molecule to function. *Morgan & Claypool Life Science*. 3: 1-146.

454. Yun CH, Lundgren A, Azem J, Sjoling A, Holmgren J, Svennerholm AM, Lundin BS. **(2005)** Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. *Infect Immun*. 73: 1482-1490.

455. Zanotti G, Papinutto E, Dundon W, Battistutta R, Seveso M, Giudice G, Rappuolib R, Namavar F, Sparrius M, Veerman EC, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM. **(1998)** Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect Immun*. 66: 444–447.

456. Zhang QB, Dawodu JB, Husain A, Etolhi G, Gemmell CG, Russell RI. **(1997)** Association of antral mucosal levels of interleukin 8 and reactive oxygen radicals in patients infected with *Helicobacter pylori*. *Clin. Sci*. 92: 69-73.

457. Zhu Y, Shu X, Chen J, Xie Y, Xu P, Huang DQ, Lu NH. **(2008)** Effect of *Helicobacter pylori* eradication on oncogenes and cell proliferation. *Eur J Clin Invest*. 38: 628–633.

Oświadczenia współautorów o udziale w publikacji

Mgr Weroniki Gonciarz

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: weronika.gonciarz@biol.uni.lodz.pl

Gonciarz W., Walencka M., Moran A.P., Obuchowski M., Hinc K., Chmiela M. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. Journal of Biomedical Science. 2019; 26:23.

*Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi **64%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu doświadczeń, analizie wyników, opracowaniu manuskryptu, a także edycji pracy.*

Gonciar Weronika
.....
podpis współautora

Gonciarz W., Krupa A., Obuchowski M., Hinc K., Moran A.P., Gajewski A., Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLOsOne. **2019**; 7:1, e0220636.

*Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi **60%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu doświadczeń, analizie wyników, opracowaniu manuskryptu, a także edycji pracy.*

Gonciar Weronika
.....
podpis współautora

Gonciarz W., Krupa A., Chmiela M. Proregenerative Activity of IL-33 in Gastric Tissue Cells Undergoing *Helicobacter pylori*-Induced Apoptosis. International Journal of Molecular Science. **2020;** 21:1801; doi:10.3390/ijms21051801,

*Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi **50%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu doświadczeń, analizie wyników, opracowaniu manuskryptu, a także edycji pracy*

Gonciar Weronika
.....
podpis współautora

Chmiela M., **Gonciarz W.** Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology. **2017;** 23: 3964–3977.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **40%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, ocenę postępów pracy i uczestnictwo w przygotowaniu manuskryptu.*

Gonciar Weronika
.....
podpis współautora

Gonciarz W., Matusiak A., Rudnicka K., Rechciński T., Chałubiński M., Czkwianianc E., Broncel M., Gajewski A., Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 39–149.

*Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi **60%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu doświadczeń, analizie wyników, opracowaniu manuskryptu, a także edycji pracy.*

Gonciar Weronika
.....
podpis współautora

Prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmieli

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

Gonciarz W., Walencka M., Moran A.P., Obuchowski M., Hinc K., **Chmiela M.** Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. Journal of Biomedical Science. 2019; 26:23.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **20%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, nadzór nad realizacją badań, ocenę postępów pracy, uczestnictwo w interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.*

M.M. Chmiela
.....
podpis współautora

Gonciarz W., Krupa A., Obuchowski M., Hinc K., Moran A.P., Gajewski A., **Chmiela M.** The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLOsOne. **2019**; 7:1, e0220636.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **26%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, nadzór nad realizacją badań, ocenę postępów pracy, uczestnictwo w interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.*

M.M. Chmiela
.....
podpis współautora

Gonciarz W., Krupa A., **Chmiela M.** Proregenerative Activity of IL-33 in Gastric Tissue Cells Undergoing *Helicobacter pylori*-Induced Apoptosis. International Journal of Molecular Science. **2020;** 21:1801; doi:10.3390/ijms21051801,

*Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi **30%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, nadzór nad realizacją badań, ocenę postępów pracy, uczestnictwo w interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.*

M.M. Chmiela
.....
podpis współautora

Chmiela M., Gonciarz W. Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology,* **2017;** 23: 3964–3977.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **60%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, ocenę postępów pracy i uczestnictwo w przygotowaniu manuskryptu.*

M.M. Chmiela
.....
podpis współautora

Gonciarz W., Matusiak A., Rudnicka K., Rechciński T., Chałubiński M., Czkwianianc E., Broncel M., Gajewski A., **Chmiela M.** Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 39–149.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **28%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, nadzór nad realizacją badań, ocenę postępów pracy, uczestnictwo w interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.*

M.M. Chmiela
.....
podpis współautora

Dr hab. Agnieszki Krupy

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: agnieszka.krupa@biol.uni.lodz.pl

Gonciarz W., **Krupa A.,** Chmiela M. Proregenerative Activity of IL-33 in Gastric Tissue Cells Undergoing *Helicobacter pylori*-Induced Apoptosis. International Journal of Molecular Science. **2020;** 21:1801; doi:10.3390/ijms21051801,

Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi ***20%****, który obejmował współudział w wykonywaniu doświadczeń i opracowaniu manuskryptu.*

Agnieszka Krupa
.....
podpis współautora

Gonciarz W., **Krupa A.,** Obuchowski M., Hinc K., Moran A.P., Gajewski A., Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLOsOne. **2019**; 7:1, e0220636.

Oświadczam, że mój udział w ww. pracy wynosi ***10%****, który obejmował współudział w wykonywaniu doświadczeń i opracowaniu manuskryptu.*

Agnieszka Krupa
.....
podpis współautora

Dr Marii Walenckiej

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: mwalencka@yahoo.com

Gonciarz W., **Walencka M.,** Moran A.P., Obuchowski M., Hinc K., Chmiela M. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. Journal of Biomedical Science. 2019; 26:23.

Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi ***5%****, który polegał na współudziale w realizacji części doświadczeń.*

Marii Walencka

.....

podpis współautora

Dr hab. n. med. Tomasza Rechcińskiego

Katedra i Klinika Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. dr. Wł. Biegańskiego, ul. Kniaziewicza 1/5, 91-347 Łódź; e-mail: tomasz.rechcinski.@ umed.lodz.pl

Gonciarz W., Matusiak A., Rudnicka K., **Rechciński T.,** Chałubiński M., Czkwianianc E., Broncel M., Gajewski A., Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 39–149.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **1%**, który obejmował pobranie materiału biologicznego od pacjentów.*

.....

podpis współautora

Dr hab. Krzysztofa Hinca

Katedra Biotechnologii Medycznej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk;
e-mail: krzysztof.hinc@biotech.ug.edu.pl

Gonciarz W., Walencka M., Moran A.P., Obuchowski M., **Hinc K.,** Chmiela M. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. Journal of Biomedical Science. 2019; 26:23.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **4%**, który polegał na opracowaniu koncepcji i przygotowaniu rekombinowanego białka UreA*

.....
podpis współautora

Gonciarz W., Krupa A., Obuchowski M., **Hinc K.,** Moran A.P., Gajewski A., Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLOsOne. **2019**; 7:1, e0220636.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **1%**, który polegał na opracowaniu koncepcji i przygotowaniu rekombinowanego białka UreA*

.....
podpis współautora

Prof. dr hab. Michała Obuchowskiego

Katedra Biotechnologii Medycznej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk;
e-mail: michal.obuchowski@biotech.ug.edu.pl

Gonciarz W., Walencka M., Moran A.P., **Obuchowski M.,** Hinc K., Chmiela M. Upregulation of MUC5AC production and deposition of Lewis determinants by *Helicobacter pylori* facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. Journal of Biomedical Science. 2019; 26:23.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **4%**, który polegał na opracowaniu koncepcji otrzymywania rekombinowanego białka UreA*

.....

podpis współautora

Gonciarz W., Krupa A., **Obuchowski M.,** Hinc K., Moran A.P., Gajewski A., Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLOsOne. **2019**; 7:1, e0220636.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **1%**, który polegał na opracowaniu koncepcji i przygotowaniu rekombinowanego białka UreA*

.....

podpis współautora

Dr Adriana Gajewskiego

Klinika Immunologii, Alergii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź, e-mail: gajewski.adrian5@gmail.com

Gonciarz W., Krupa A., Obuchowski M., Hinc K., Moran A.P., **Gajewski A.,** Chmiela M. The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. PLOsOne. **2019**; 7:1, e0220636.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **1%**, który polegał na współudziale w realizacji części doświadczeń.*

.....
podpis współautora

Gonciarz W., Matusiak A., Rudnicka K., Rechciński T., Chałubiński M., Czkwianianc E., Broncel M., **Gajewski A.,** Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 39–149.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **1%**, który polegał na współudziale w realizacji części doświadczeń.*

.....
podpis współautora

Dr Agnieszki Matusiak

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: agnieszka.matusiak.@biol.uni.lodz.pl

Gonciarz W., **Matusiak A.,** Rudnicka K., Rechciński T., Chałubiński M., Czkwianianc E., Broncel M., Gajewski A., Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127:139–149.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **5%**, który obejmował walidację wybranych metod badawczych.*

Agnieszka Matusiak
podpis współautora

Dr hab. n. med. Macieja Chałubińskiego

Klinika Immunologii, Alergii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź, e-mail: mchalubinski@op.pl

Gonciarz W., Matusiak A., Rudnicka K., Rechciński T., **Chałubiński M.,** Czkwianianc E., Broncel M., Gajewski A., Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 39–149.

*Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi **1%**, który obejmował pobranie materiału biologicznego od pacjentów.*

.....

podpis współautora

Dr Karoliny Rudnickiej

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: karolina.rudnicka@biol.uni.lodz.pl

Gonciarz W., Matusiak A., **Rudnicka K.,** Rechciński T., Chałubiński M., Czkwianianc E., Broncel M., Gajewski A., Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 139–149.

Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi ***2%****, i obejmował walidację wybranych metod badawczych.*

.....

podpis współautora

Dr hab. n. med., prof. nadzw. ICZMP Elżbiety Czkwaniec

Klinika Gastroenterologii, Alergologii i Pediatrii Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź; e-mail: kpg@iczmp.edu.pl

Gonciarz W., Matusiak A., Rudnicka K., Rechciński T., Chałubiński M., **Czkwianianc E.,** Broncel M., Gajewski A., Chmiela M. Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (ATVLA) with homology to *H. pylori* HspB in *H. pylori* infected patients. APMIS. **2019;** 127: 39–149.

Oświadczam, że mój udział ww. pracy wynosi 1%, który obejmował pobranie materiału biologicznego od pacjentów.

Elżbieta Czkwianianc

podpis współautora