

Ewa Nikoronow, Renata Godlewska, Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka*

Zakład Genetyki Bakterii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w maju 2008 r.

1. Objawy chorobowe, epidemiologia zakażeń *H. pylori*. 2. Przewycięzenie pierwszej fizjologicznej bariery – niskie pH w żołądku. 3. Rozpoznanie patogenu przez komórki nabłonkowe. 3.1. Oddziaływanie *H. pylori* z receptorami TLR. 3.2. Stymulacja receptorów NOD. 4. Oddziaływanie *H. pylori* z profesjonalnymi komórkami żernymi. 5. Wpływ infekcji *H. pylori* na aktywność eozynofili, bazofili, komórek tucznych i komórek NK. 6. Podsumowanie

The interaction of *Helicobacter pylori* with the innate immune system

Abstract: *Helicobacter pylori*, Gram-negative spiral-shaped bacterium and a member of the ϵ -Proteobacteria, colonizes the gastric mucosa of humans. It was first isolated in 1983 from a patient with chronic active gastritis. It is now recognized that *H. pylori* infects about half of the world's population (87% of the Polish population). *H. pylori* has been identified as the causative agent of chronic inflammation, chronic gastritis and peptic ulceration and is considered a risk factor for the development of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and adenocarcinoma of the stomach. Based on the results of clinical studies, the World Health Organization has classified *H. pylori* as a class I carcinogen. Although more than 50% of the human population is infected with *H. pylori* only a subset develops the disease. A distinctive feature of *H. pylori* infection is its long-term colonization of the stomach. This review presents recent developments concerning the interference of *H. pylori* with the host innate immune system. *H. pylori* possesses many adaptations allowing the pathogen to overcome the activities of the innate immune system, such as: low pH in the stomach, the recognition by epithelial cells and phagocytosis. The suppression of the host defence mechanisms and the modulation of the immune response enable the pathogen to generate chronic infections.

1. Disease symptoms and epidemiology of *H. pylori* infection. 2. Overcoming the first physiological barrier – low pH in the stomach. 3. Recognition of the pathogen by epithelial cells. 3.1. Interference of *H. pylori* with TLR receptors. 3.2. Stimulation of NOD receptors. 4. Interaction with phagocytic cells. 5. Influence of the *H. pylori* infection on the activity of eosinophiles, basophiles, mast cells and NK cells. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*, odporność wrodzona, receptory TLR, receptory NOD, komórki fagocytyjające
Key words: *Helicobacter pylori*, innate immunity, TLR receptors, NOD receptors, phagocytic cells

1. Objawy chorobowe, epidemiologia zakażeń *H. pylori*

Helicobacter pylori jest niewielką od 0.5 do 3 μ m długości gram-ujemną, urzęsioną, pałeczką, należącą do klasy ϵ -proteobacteria. Jest patogenem człowieka, czynnikiem etiologicznym chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego. Droga przenoszenia się patogenu nie została dotąd jednoznacznie określona, prawdopodobnie do zakażenia dochodzi drogą kropelkową, lub przez spożywanie pokarmu zanieczyszczonego tymi mikroorganizmami. Do infekcji dochodzi najczęściej we wczesnym dzieciństwie i często zakażenie utrzymuje się przez cały okres życia człowieka. Zakażenie tą bakterią jest niezwykle rozpowszechnione i dotyka niemal wszystkich ludzi w krajach rozwijających się (80–90%) i około 30% populacji w krajach wysokorozwiniętych, co daje szacunkową liczbę ponad 2 miliardów zainfekowanych. Powodem tak dużego rozpowszechnienia bakterii jest jej zdolność do wywoływania chronicznej infekcji, długotrwałej i bezobjawo-

wej kolonizacji śluzówki żołądka. Infekcja *H. pylori* nie powoduje powstania żadnych dolegliwości u zdecydowanej większości osób zakażonych. Jedynie u około 10% osób może być przyczyną wystąpienia objawów chorobowych [55]. Są one bardzo zróżnicowane i zależne od genotypu nie tylko szczepu bakterii ale i zakażonego pacjenta, jego wieku, stanu zdrowia, diety, trybu życia. Początkowo jest to ostre zapalenie śluzówki żołądka, które nie leczone przechodzi w stan chroniczny co może prowadzić do poważnych uszkodzeń śluzówki żołądka, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy (10–30% zainfekowanych) a nawet choroby nowotworowej – adenocarcinoma lub lymphoma – (1–3% zakażonych). W roku 1994 WHO uznała *H. pylori* za czynnik o udowodnionym działaniu rakotwórczym. Bakteria została zaliczona do I klasy karcinogenów. W skali rocznej 5.4 % wszystkich przypadków chorób nowotworowych rejestrowanych na świecie to choroby nowotworowe żołądka powiązane z infekcją *H. pylori* [67] W 1997 roku została opublikowana pierwsza pełna sekwencja nukleotydowa

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl; tel. (022) 55 41 216

genomu *H. pylori* szczepu 26695, wyizolowanego od pacjenta z chronicznym zapaleniem błony śluzowej żołądka [76]. Dwa lata później zsekwencjonowano genom szczepu J99 otrzymanego od pacjenta z objawami choroby wrzodowej dwunastnicy [2]. Aktualnie znamy także pełen zapis genetyczny *H. hepaticus* [68], potencjalnego czynnika etiologicznego choroby nowotworowej wątroby oraz kilku innych szczepów mikroorganizmów należących do klasy *Epsilonproteobacteria* (*Arcobacter butzleri*, *Campylobacter jejuni*, *Nitratiruptor* sp., *Sulfurimonas denitrificans*, *Sulfurovum* sp., *Wolinella succinogenes*). Posiadane informacje ułatwiają prześledzenie procesów ewolucyjnych tej grupy mikroorganizmów oraz identyfikację nowych czynników wirulencji. Do podstawowych czynników wirulencji *H. pylori* zaliczamy: ureazę, adhezyny, toksynę wakuolizującą VacA, białko CagA i inne białka kodowane w obrębie wyspy patogeniczności, białko aktywujące neutrofile NapA oraz wiele innych (ze dwie przegładówki o czynnikach wirulencji). Analiza przeprowadzona metodą STM (signature tagged mutagenesis) doprowadziła do identyfikacji 47 genów których produkty niezbędne są do zasiedlenia śluzówki jelit przez *H. pylori* [45].

Podejrzewa się że, *H. pylori* towarzyszy człowiekowi już od czasów wielkiej migracji z Afryki 50 000–100 000 lat temu. Od tego czasu ewolucja tej bakterii patogenowej i gospodarza przebiegała razem i pozwoliła na wytworzenie wielu przystosowań umożliwiających jej przetrwanie w organizmie gospodarza [21]. Stabilne zasiedlenie śluzówki żołądka wymaga wytworzenia swoistej równowagi pomiędzy „szkodliwym” oddziaływaniem bakterii a próbującym ją usunąć układem odpornościowym. Równowaga ta jest zależna od genetycznych uwarunkowań zarówno gospodarza jak i patogenu. *H. pylori* jest bakterią o wysokim poziomie zmienności genetycznej [27]. Dodatkowo jest mikroorganizmem naturalnie kompetentnym do pobierania DNA, co przy często spotykanych infekcjach mieszanym prowadzi do intensywnej wymiany informacji genetycznej. Dodatkowo w populacji *H. pylori* stosunkowo często spotykane są szczepy mutatorowe, o podwyższonej częstości mutacji spontanicznych. Również częstość rekombinacji jest stosunkowo wysoka dzięki dużej liczbie sekwencji repetytywnych występujących w genomach szczepów *H. pylori* [10].

2. Pierwsza bariera ochronna – niskie pH w żołądku

Pierwszą przeszkodą którą musi pokonać każdy patogen dla którego wrota zakażenia stanowi układ pokarmowy jest niskie pH żołądka. Ten prosty mechanizm obronny naszego organizmu jest niezwykle skuteczny.

H. pylori wykształcił mechanizm pozwalający przeżyć w tym nieprzyjawnym środowisku [19]. Bakteryjna ureaza jest cytoplazmatycznym enzymem, stanowiącym od 5 do 10% wszystkich białek mikroorganizmu [25]. Należy do hydrolaz i przeprowadza reakcję rozkładu mocznika do amoniaku i CO₂. Powstający amoniak reaguje z żołądkowym kwasem solnym. W efekcie powstaje sól (chlorek amonu), neutralizująca pH i wytwarzająca wokół komórek mikroorganizmu strefę o pH zbliżonym do 7 [24]. W pH niższym niż 6.5 dochodzi do otwarcia kanału w błonie wewnętrznej budowanego przez białko UreI co umożliwia dostęp urazy do mocznika. Powstający amoniak dyfunduje do peryplazmy i buforuje także środowisko tej niszy ekologicznej [13]. Komórki nabłonka błon śluzowych żołądka są tak samo wrażliwe na działanie kwasu solnego jak wszystkie inne komórki naszego organizmu. Przed uszkodzeniami chroni je warstwa glikoproteinowego śluzu zwanego mucyną. Warstwa mucyny jest przepuszczalna dla jonów H⁺ tylko w jedną stronę – do światła żołądka, ale nie w przeciwną, dzięki czemu pod warstwą śluzu pH jest neutralne. Śluz pełni również funkcję ochronną przed patogenami. Występuje w nim duże stężenie przeciwciał klasy IgA oraz składników układu dopełniacza. Ponadto stanowi on fizyczną barierę, która zatrzymuje mikroorganizmy. *H. pylori* również korzysta z ochrony przed szkodliwym działaniem kwasu solnego jaką daje mucyna, bakteria po dostaniu się do żołądka szybko przemieszcza się do warstw śluzu, a następnie przez nią do powierzchni komórek nabłonkowych, orientując się w przestrzeni dzięki występującemu w mucynie gradientowi pH [64]. Ruch ten jest możliwy dzięki rzęskom, które umożliwiają sprawne przemieszczanie się nawet w tak gęstym środowisku. Pod warstwą mucyny, *H. pylori* natrafia na idealne środowisko, bogate w substancje odżywcze, o neutralnym pH, gdzie może się namnażać.

3. Rozpoznanie patogenu przez komórki nabłonkowe

Pierwszym krokiem do zniszczenia drobnoustroju jest jego rozpoznanie. Komórki odporności wrodzonej człowieka identyfikują mikroorganizmy patogenne za pośrednictwem receptorów rozpoznających tzw. wzorce molekularne – PAMP (pathogen associated molecular patterns), czyli konserwowane ewolucyjnie struktury drobnoustrojów takie jak peptydoglikan, LPS, flageliny i inne. PAMP są strukturami charakterystycznymi dla całych grup bakterii, a więc dzięki jednemu receptorowi np. rozpoznającemu LPS rozpoznane może zostać wiele gatunków bakterii. Receptory rozpoznające wzorce molekularne – PRR (pattern recognition receptors), są dużą rodziną białek zarówno

zewewnętrznych, jak i błonowych oraz cytoplazmatycznych. Jedną z głównych grup receptorów należących do PRR są błonowe receptory TLR (Toll-like receptors) oraz wewnątrz komórkowe receptory NOD (nuclear oligomerization domain).

3.1. Oddziaływanie *H. pylori* z receptorami TLR

Receptory Toll odkryto podczas badań nad procesami embriogenezy muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) w 1994 roku. Dokonane 4 lata później odkrycie białek błonowych o bardzo zbliżonych sekwencjach aminokwasowych w ludzkim organizmie (Toll-like) [62] zapoczątkowało badania nad tymi PRR. Dotychczas opisano 11 tego typu cząsteczek (TLR1-TLR11), choć nie dla wszystkich z nich zidentyfikowano odpowiadające im ligandy. Receptory te odgrywają istotną rolę w indukcji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Związanie ligandu przez TLR zapoczątkowuje transdukcję sygnałów z udziałem czynników transkrypcyjnych takich jak np. NF- κ B czy Ap-1. NF- κ B aktywuje proces transkrypcji wielu genów w tym genów kodujących cytokiny, chemokiny oraz ich receptory [48]. Komórki nabłonkowe, jak ostatnio wykazano, nie tylko stanowią barierę chroniącą organizm gospodarza przed przenikaniem patogennych mikroorganizmów do głębiej położonych tkanek, ale dodatkowo aktywnie uczestniczą w indukcji odpowiedzi immunologicznej, wrodzonej i pośrednio także nabytej. Wzmoczona produkcja cytokin będąca skutkiem ich kontaktu z patogenem powoduje napływ i aktywację komórek układu odpornościowego: makrofagów, komórek dendrytycznych, neutrofilii, granulocytów, komórek tucznych, limfocytów (rozwój stanu zapalnego). *H. pylori* jako patogen zasiedlający warstwę mucyny ludzkiego żołądka i przylegający do komórek nabłonkowych styka się z receptorami TLR na ich powierzchni co w przypadku większości infekcji bakteryjnych skutkuje indukcją silnego stanu zapalnego. Wyniki badań ostatnich lat wykazały, że bakteria wykształciła szereg przystosowań uniemożliwiających lub utrudniających jej rozpoznanie przez TLR, co pozwala na ustanowienie chronicznej infekcji, stanu równowagi pomiędzy mikroorganizmem a organizmem gospodarza.

Ekspresja i rozmieszczenie receptorów TLR na powierzchni komórek nabłonkowych wyścielających układ pokarmowy i tych stosowanych w badaniach *in vitro* jest różna. W komórkach nabłonkowych jelit ekspresji ulegają głównie geny związane z produkcją TLR5. Komórki nabłonka żołądka wyposażone są w geny odpowiedzialne za wytwarzanie TLR2, 4, 5 i 9. Ich rozkład na powierzchni nabłonka żołądka ulega zmianie podczas infekcji. TLR5 i TLR9 przemieszczają się do powierzchni przypadkowej, podczas gdy rozkład TLR4 na powierzchni szczytowej i przypad-

stawnej jest podobny w zainfekowanej i niezainfekowanej śluzówce. Ekspresja genów kodujących TLR jest też często różna w komórkach pierwotnych i liniach komórkowych, co skutkuje inną odpowiedzią na ich stymulację. Pierwotne komórki nabłonkowe śluzówki żołądka ludzi pochodzące z biopsji nie wykazują ekspresji receptorów TLR4 a po infekcji *H. pylori* odpowiadają wzmoczoną produkcją IL-6, IL-8 oraz TNF- α , podczas gdy komórki linii AGS, MKN-45 czy NCI-N87 wyrażają TLR4, a odpowiedzią na infekcję jest podwyższony poziom IL-8 [5]. Stymulacja wytwarzania IL-8 zawsze wymaga obecności w genomie patogenu wyspy patogenności Cag.

TLR4 jest najdokładniej poznanym receptorem tej rodziny białek. Pierwotnie został opisany jako białko powierzchniowe komórek linii mieloidalnej ale dalsze badania wykazały jego obecność także, choć w niewielkiej ilości, na powierzchni komórek nabłonka jelit. Obecność mRNA tlr4 udokumentowano w komórkach kilku linii pochodnych ludzkich komórek nabłonka żołądka np. AGS, MKN54 i innych [5, 66]. Ligandem receptorów TLR4 jest głównie LPS bakterii Gramujemnych, choć jest on także aktywowany przez inne cząsteczki takie jak np. kwasy lipoteichojoyowe czy pneumolizyna. W procesie ewolucji LPS *H. pylori* przekształcił się w formę o od 100 do 1000 razy mniejszym powinowactwie od tego receptora niż np. LPS komórek rodzaju *Salmonella* sp. Odmienna budowa LPS *H. pylori*, a nie brak receptora lub cząsteczek pomocniczych CD14 i MD-2, sprawia że patogen właściwie nie jest rozpoznawany przez ten receptor [5, 48, 66]. Także zablokowanie receptora przez specyficzne przeciwciała nie obniża poziomu indukowanej zakażeniem IL-8 i aktywacji NF- κ B [66]. Wyniki niektórych eksperymentów sugerują, że TLR4 może być wykorzystywany przez ten mikroorganizm jako receptor w procesie adhezji [11]. Pojawiały się też doniesienia, że LPS *H. pylori* nietypowo aktywuje inny receptor rodziny TLR – TLR2 [65] a nie TLR4. Ale w niektórych badaniach wykazano aktywację komórek z udziałem TLR4 [44, 63]. Tak więc, rola tego receptora w reakcji na zakażenie *H. pylori in vivo* jest nadal kontrowersyjna a rozbieżności w prezentowanych przez różne ośrodki danych eksperymentalnych często wynikają z zastosowania odmiennych modeli badawczych (genotyp szczepu, rodzaj linii komórkowej).

TLR2 receptor rozpoznaje wiele ligandów takich jak lipoproteiny, lipopeptydy, peptydoglikan czy kwasy lipoteichojoyowe. Obecnie uważa się, że aktywacja tego receptora pełni kluczową rolę w rozpoznaniu *H. pylori* przez komórki nabłonkowe. Choć nie udało się, jak dotąd, jednoznacznie określić cząsteczki będącej ligandem dla TLR2, to w genomie patogenu odnaleziono kilka genów kodujących lipoproteiny potencjalnie oddziałujące z TLR2 [50]. Wyniki niektórych

eksperymentów wskazują na aktywację TLR2 komórek nabłonkowych w zakażeniach *H. pylori* przez nietypowe ligandy. Oprócz wspomnianego wyżej LPSu udokumentowano inicjację ścieżek sygnalizacyjnych zależnych od TLR2 oraz TLR4 przez białko szoku cieplnego *H. pylori* HSP 60 [71].

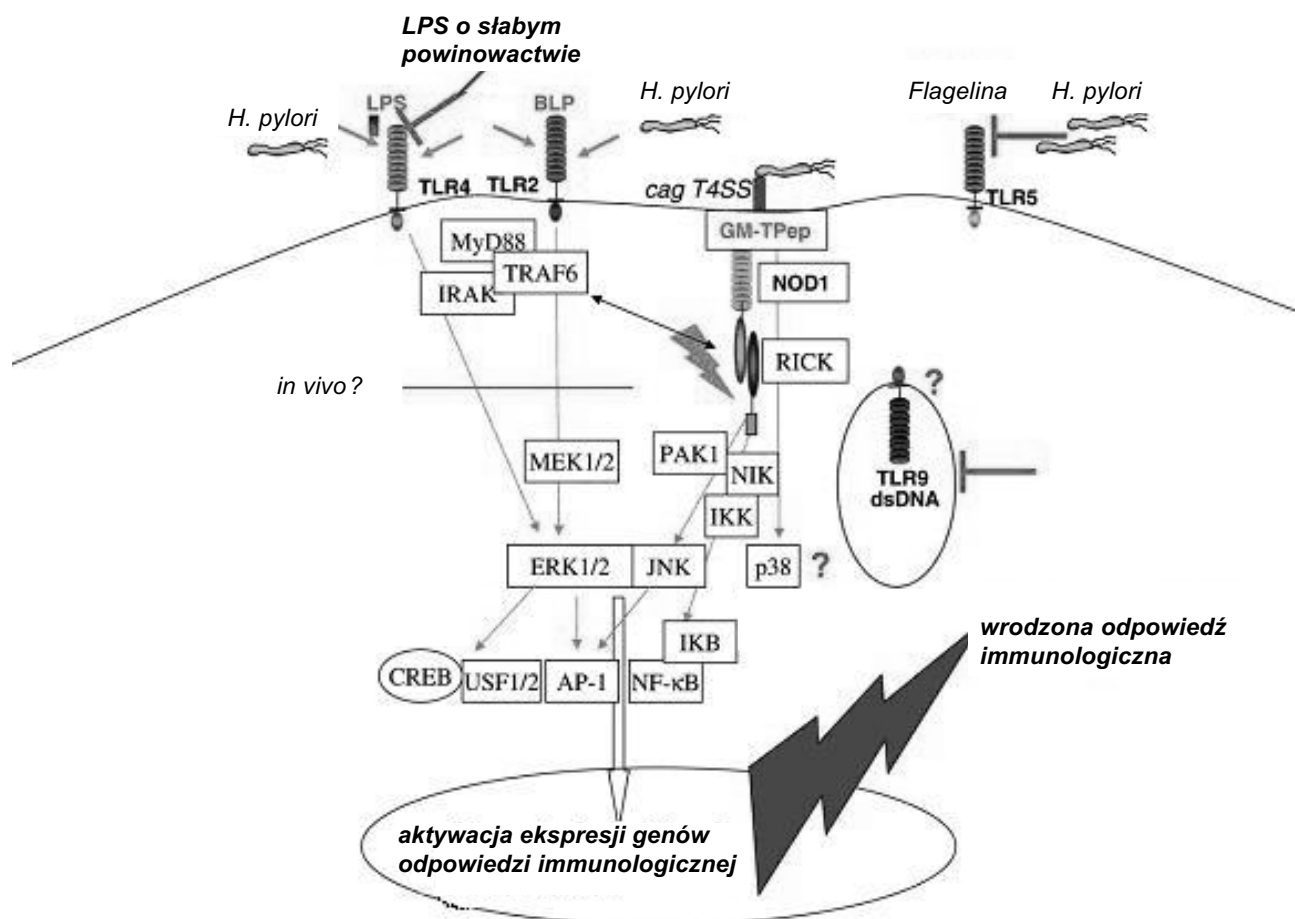
Komórki z udziałem TLR5 są stymulowane rozpoznaniem białka budującego rzęski bakteryjne – flageliny. Rzęski *H. pylori* są zbudowane głównie z monomerów dwu flagelin FlaA i FlaB. Wykazano, że monomery te mają bardzo niski potencjał aktywacji TLR5 [29]. Oddziaływanie *H. pylori* z TLR5 znacząco różni ten mikroorganizm od niektórych patogenów układu pokarmowego. Silnym stymulatorem TLR5 komórek epitelialnych jelit jest flagelina FliC *Salmonella enterica*. Nawet komensualna bakteria *Escherichia coli* produkuje flagelinę o większym powinowactwie do TLR5, choć jej obecność nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej [48]. Podobnie do flageliny *H. pylori* flagelina *Campylobacter jejuni*, mikroorganizmu będącego także przedstawicielem klasy Epsilonproteobacteria, słabo stymuluje komórki z TLR5. Porównanie sekwencji aminokwasowych kilku flagelin (*H. pylori*, *C. jejuni* i *S. enterica*, *E. coli*) wykazało, że u przebadanych przedstawicieli Epsilonproteobacteria nie są zachowane konserwowane aminokwasy istotne w stymulacji TLR5 przez białko FliC *Salmonella* [80].

TLR9, umiejscowiony w błonie pęcherzyków endosomalnych zlokalizowanych bezpośrednio pod błoną komórkową, rozpoznaje niemetylowane motywy CpG obecne w materiale genetycznym mikroorganizmów. DNA bakteryjny jest z reguły metylowany w o wiele mniejszym stopniu niż DNA komórek eukariotycznych. O aktywacji TLR9 decyduje nie tylko brak metylacji motywów CpG ale także flankujące je sekwencje nukleotydowe. Jak dotąd DNA bakteryjny zawierający motywy CpG jest jedynym zidentyfikowanym ligandem dla TLR9. Po stymulacji komórek wyrażających TLR9 przez CpG ODN, oligonukleotydy wnikają do pęcherzyków endosomalnych, a następnie te organelle wnikają do jądra komórkowego [72]. Szlaki sygnalizacyjne indukowane aktywacją TLR9 przebiegają podobnie, choć nie identycznie jak w wypadku innych klas receptorów TLR, prowadząc do aktywacji genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Jednak ten system rozpoznania mikroorganizmów zawodzi w przypadku *H. pylori*. DNA *H. pylori* jak na organizm prokariotyczny, charakteryzuje się wyjątkowo wysokim poziomem metylacji. W genomie patogenu wykryto aż 11 genów kodujących potencjalne metylazy [78]. Wysoki poziom metylacji motywów CpG DNA *H. pylori* w znaczący sposób obniża poziom aktywacji TLR 9 lecz nie wystarcza by całkowicie jej zapobiec i pewien poziom aktywacji tego receptora był obserwowany w eksperymentach *in vitro* [63].

Z przedstawionych wyżej danych eksperymentalnych wynika, że aktywacja receptorów TLR2, 4, 5 i 9 nie jest odpowiedzialna za wzmożone wydzielanie cytokin, głównie IL-8 przez komórki epitelialne po kontakcie z *H. pylori*.

3.2. Stymulacja receptorów NOD

NOD są stosunkowo niedawno opisanymi cytoplazmatycznymi receptorami PRR [30]. Odgrywają one ważną rolę w indukcji odpowiedzi immunologicznej przez patogeny inwazyjne, wnikające do wnętrza komórek eukariotycznych. Poza indukcją stanu zapalnego aktywacja receptorów wpływa na aktywację kaspaz i procesy apoptozy. Duże zainteresowanie mechanizmem działania białek NOD wynika z faktu, że obecność mutacji w genie kodującym NOD2 jest skorelowana z ryzykiem wystąpienia chronicznego stanu zapalnego jelit, choroby Leśniowskiego-Crohna. Opiszano dwa receptory tego typu NOD1 oraz NOD2. Obydwa białka posiadają modułową budowę i składają się z trzech domen: C-końcowego fragmentu bogatego w leucyny (LRR – leucine rich repeat), centralnego fragmentu wiążącego nukleotydy (NBS – nucleotide binding site) oraz jednej lub dwu domen CARD (caspase activation and recruitment domain). Aktywacja tych receptorów prowadzi do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego NF- κ B a tym samym do indukcji odpowiedzi prozapalnej komórek eukariotycznych. Stosunkowo niedawno udało się zidentyfikować cząsteczki będące ligandami białek NOD. Są to fragmenty rozpadu osłon komórkowych mikroorganizmów, muropeptydy. NOD1 rozpoznaje molekuly charakterystyczne przede wszystkim dla osłon bakterii Gram-ujemnych i nielicznych gramodatnich. NOD2 rozpoznaje fragmenty peptydoglikanu (PGN), dwupeptyd muramylowy (MDP) MurNAc-B-Ala-D-isoGln, zarówno bakterii gramodatnich jak i gram ujemnych [30, 15, 43]. Ponieważ receptory NOD rozpoznają produkty rozpadu PGN, każdy mechanizm blokujący ich powstawanie będzie obniżał poziom indukowanej odpowiedzi prozapalnej. Dodatkowo ligandy muszą dotrzeć do wewnątrzkomórkowego receptora. Udokumentowano stymulację NOD przez fragmenty PGN *Shigella*. Ten enteropatogen po pobraniu przez komórki eukariotyczne jest uwalniany do cytozolu gdzie podczas jego namnażania uwalniane są fragmenty PGN [31]. *H. pylori* nie należy do bakterii inwazyjnych i jest internalizowany z niską częstością (liczba komórek odnajdowanych we wnętrzu komórek eukariotycznych nie przekracza 0.1%) [77]. Pomimo tego udowodniono że szczepy posiadające w swym genomie aktywną wyspę patogenności cag PAI są zdolne do wiązania wewnątrzkomórkowego receptora NOD1 i wywołania odpowiedzi prozapalnej komórek nabłonkowych związanej



Rys 1. Schemat rozwoju odpowiedzi immunologicznej wrodzonej wywołanej zakażeniem *H. pylori*, zależnej i niezależnej od cag PAI. Nie jest do końca wyjaśnione, który z receptorów dla wzorców molekularnych odgrywa główną rolę w odpowiedzi na infekcję *H. pylori* *in vivo*. Istotny wydaje się mechanizm aktywacji NF- κ B poprzez stymulację NOD1. NOD1 rozpoznaje produkty rozkładu peptydoglikanu (muropeptydy) transportowane do komórki przez system sekrecji typu IV kodowany przez cag PAI. *H. pylori* nie jest rozpoznawany przez TLR4, TLR5 i prawdopodobnie TLR9. Reprinted from *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 295, Lee S.K., Josenhans C.: *Helicobacter pylori* and the innate immune system, p.p. 325–334 (2005), copyright with permission from Elsevier [48].

z aktywacją NF- κ B. Proces ten zachodzi dzięki transportowi fragmentów ściany komórkowej do wnętrza komórek eukariotycznych [28, 77] i wymaga aktywnego systemu transportu typu IV, choć jest niezależny od obecności funkcjonalnego białka CagA [28], co może również stanowić wyjaśnienie faktu iż szczepy cag⁺ są bardziej immunogenne oraz są zdecydowanie częściej izolowane od pacjentów z przewlekłymi stanami zapalnymi oraz chorobą wrzodową [59]. Dla kilku gatunków bakterii patogennych udokumentowano, że stymulacja receptorów NOD uwarunkowana jest aktywnością enzymów biorących udział w przebudowie osłon komórkowych [12, 77]. Wykazano, że szczepy *H. pylori* defektywne w wytwarzaniu transglikozylaz biorących udział w obrocie peptydoglikanu indukują znacznie niższy poziom NF- κ B niż szczepy typu dzikiego. Wykazano także podwyższony poziom transglikozylaz w biopsjach pobranych od osób zakażonych [37]. Podsumowując można stwierdzić, że w indukcji produkcji cytokin stanu zapalnego przez komórki *H. pylori* główną rolę odgrywa szlak polegający na ak-

tywacji cytozolowych receptorów NOD1 oraz aktywacja receptorów TLR2 przez lipoproteiny. Nadal wiele szczegółów tych procesów wymaga wyjaśnienia, a zwłaszcza przebieg procesów *in vivo*. Warto także wspomnieć, że poziom zaindukowanego stanu zapalnego zależy również od genotypu gospodarza.

Rys.1 prezentuje stymulację receptorów TLR i NOD przez komórki *H. pylori*.

4. Oddziaływanie *H. pylori* z profesjonalnymi komórkami żernymi

Odpowiedź makrofagów i monocytów, w przeciwieństwie do odpowiedzi komórek nabłonkowych, jest niezależna od obecności w genomie patogenu wyspy patogenności cag i przebiega poprzez aktywację szlaków transdukcji sygnału IRAK, kinazy MAP i NF- κ B [40, 6]. Makrofagi są głównymi komórkami układu immunologicznego odpowiedzialnymi za podwyższony poziom IL-6 w stanach zapalnych błony śluzowej

żołądka wywołanych infekcją *H. pylori*. Komórki te charakteryzują się także podwyższonym poziomem mRNA dla IL-1 β i TNF- α [41, 82]. Maeda i wsp. [49] badali aktywację makrofagów myszy C3H/HeJ (uszkodzony gen tlr4) w porównaniu z aktywacją makrofagów typu dzikiego. Choć przeprowadzone eksperymenty wykazały obniżony poziom aktywacji makrofagów myszy C3H/HeJ nie wydaje się, aby LPS był głównym czynnikiem stymulującym komórki żerne. LPS *H. pylori* jest bardzo słabym stymulatorem receptorów TLR4. Innym czynnikiem potencjalnie stymulującym makrofagi może być ureaza lub białko Hsp60, homolog białka szoku cieplnego GroES. Mechanizm indukcji szlaków transdukcji sygnału pozostaje do wyjaśnienia, ponieważ jak udokumentowano makrofagi nie wykazujące ekspresji receptorów TLR2, TLR4, TLR2 i TLR4 czy białka Myd88 wytwarzają duże ilości IL-6 po aktywacji białkiem Hsp60 *H. pylori* [32]. W ostatnich latach opisano rodzinę białek *H. pylori*, zdolnych do aktywacji makrofagów do wydzielania TNF- α , nazwaną Tip α (TNF- α inducing proteins). Tip α jest 18kDa lipoproteiną zakotwiczoną w błonie wewnętrznej komórki i prawdopodobnie uwalnianą podczas infekcji do środowiska [83, 69]. Szczep *H. pylori* z mutacją w genie *tip α* charakteryzuje się zmniejszoną zdolnością do kolonizacji śluzówki żołądka myszy [35]. Ponadto wykazano, że białko Tip α indukuje ekspresję wielu genów chemokin z grupy CC i CXC [47] oraz przy współdziałaniu białka RAS wpływa na proces nowotworzenia poprzez aktywację NF- κ B [69].

Wiele bakterii patogennych jest zdolnych do wywołania apoptozy makrofagów. *H. pylori* posiada co najmniej dwa mechanizmy kierujące makrofagi na drogę programowanej śmierci. Badania na liniach komórkowych wykazały, że toksyna wakuolizująca VacA, po wnikięciu do makrofagów, powoduje uwolnienie cytochromu c z mitochondriów i indukcję apoptozy w tzw. szlaku mitochondrialnym [52]. Drugi mechanizm jest pośredni, związany z metabolizmem poliamin. *H. pylori* aktywuje w monocytach i makrofagach dwa enzymy: arginazę II (przekształcającą L-argininę w L-ornitynę) i dekarboksylazę ornityny (ODC-ornitine dekarboksylase complex) [18, 33]. Metabolizm powstających z ornityny, przy udziale ODC, poliamin prowadzi do powstania wewnątrz komórek nadtlenu wodoru (H₂O₂). Uszkadza on DNA oraz struktury komórkowe, co w efekcie wywołuje apoptozę komórki [17, 18, 33]. Aktywacja arginazy i ODC w komórkach makrofagów ma również inne istotne znaczenie dla patogenu. W zakażeniach *H. pylori* wykazano silną aktywację syntazy tlenu azotu iNOS (inducible nitric-oxide synthase) [56]. Produktem tego enzymu jest NO, związek silnie toksyczny, którego wytwarzanie stanowi jeden z głównych mechanizmów obronnych organizmu przed infekcjami

bakteryjnymi. Skutkiem działania arginazy II i ODC jest wytworzenie sperminy, która okazuje się być silnym inhibitorem iNOS powodując znaczne obniżenie produkcji NO [14]. Badania *in vitro* wykazały, że zablokowanie funkcjonowania ODC w makrofagach powoduje wzrost produkcji NO i śmierć komórek bakteryjnych [14]. Ponadto działanie arginazy, zarówno komórkowej jak i wytwarzanej przez bakterię, zmniejsza ilość L-argininy która jest także substratem dla iNOS [34], jednak mechanizm ten nie jest wystarczający by zahamować wytwarzanie NO.

Podstawową funkcją makrofagów jest fagocytoza komórek bakteryjnych i ich wewnątrzkomórkowe zabijanie. Bakterie patogenne wytworzyły wiele mechanizmów umożliwiających im uniknięcie fagocytozy lub/i przeżycie we wnętrzu fagocytów. *H. pylori* nie jest tu wyjątkiem, a jej zdolność do wywoływania chronicznych stanów zapalnych jest często tłumaczona właśnie nieefektywną odpowiedzią fagocytów. Głównym mechanizmem, dzięki któremu bakteria przeżywa we wnętrzu makrofagów jest hamowanie procesu dojrzewania fagosomu i jego fuzji z lizosomem [85]. Zdolność tę wykazują jedynie szczepy tak zwanego typu I zawierające w swoim genomie aktywną wyspę patogenności *cag* oraz produkujące toksynę VacA. Są one częściej izolowane od pacjentów z rozwiniętą chorobą wrzodową niż szczepy typu II pozbawione *cag* PAI i nie wytwarzające VacA [59]. Dojrzewanie fagosomu związane jest z uwalnianiem z jego błony białka TACO (tryptophan aspartate-containing coat protein). Szczepy typu I *H. pylori* mają zdolność do zatrzymywania TACO w błonie fagosomu i tym samym przeciwdziałania jego dojrzewaniu [85]. Systematyczna mutagenesa *cag* PAI oraz *vacA*, wykazała że to właśnie toksyna wakuolizująca jest odpowiedzialna za zatrzymywanie TACO i blokowanie procesu dojrzewania fagosomów choć mechanizm tego procesu nie został poznany [85]. Szczepy typu II również są zdolne do uniknięcia skutków fagocytozy, dzięki wspomnianym wcześniej mechanizmom wywoływania apoptozy makrofagów i hamowania wytwarzania NO, ale procent przeżywalności tych szczepów jest wyraźnie mniejszy niż szczepów produkujących VacA. Ważnym czynnikiem umożliwiającym bakterii długie przeżycie we wnętrzu fagocytów jest katalaza, enzym neutralizujący toksyczne reaktywne formy tlenu. Mutanty w genie katalazy mają wyraźnie krótszy czas przeżycia w makrofagach i jak do tej pory nie zostały wyizolowane od pacjentów, co świadczy, iż aktywność katalazy jest istotna dla przeżycia patogenu *in vivo* [7]. Istnieją także doniesienia, że *H. pylori* aktywnie blokuje sam proces fagocytozy przy wykorzystaniu elementów systemu sekrecji typu IV, w sposób zbliżony do *Yersinia enterocolitica* [60]. Proces ten jest zależny od liczby bakterii w stosunku do komórek fagocytujących, czym tłumaczy się obec-

ność nielicznych komórek bakteryjnych we wnętrzu fagosomów. Inkubacja *H. pylori* z makrofagowymi liniami komórkowymi powoduje też zablokowanie ich zdolności do fagocytozy kulek lateksowych i innych bakterii, co może być tłumaczone blokowaniem odpowiedniego szlaku transdukcji sygnału, ale dokładny mechanizm tego procesu nie został poznany [60]. Badania te są sprzeczne z innymi doniesieniami świadczącymi, że komórki *H. pylori* różnych szczepów są efektywnie fagocytowane [57, 85]. Różnice te mogą wynikać z różnorodności stosowanych metod badawczych.

Mechanizm i skutki oddziaływań *H. pylori* z neutrofilami są podobne do tych wywoływanych kontaktem patogenu z makrofagami. Neutrofile, granulocyty obojętnochłonne, są komórkami odporności wrodzonej. Charakteryzują się dużą aktywnością fagocytarną. Pojawiają się w miejscu infekcji jako pierwsze i ich głównym zadaniem jest fagocytowanie jak największej liczby patogenów. Komórki nabłonkowe błon śluzowych żołądka podczas infekcji *H. pylori* wytwarzają duże ilości IL-8 stanowiącej główny chemoatraktant dla neutrofilii. Od niedawna uważa się, że to właśnie oddziaływanie *H. pylori* z neutrofilami są istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój choroby wrzodowej [1]. Bakteria wytwarza silnie immunogenne białko z rodziny bakterioferyn zwane NAP (neutrophil activating protein), które oddziałuje z glikosfingolipidami na powierzchni neutrofilii wzmagając ekspresję integryn CD11b i CD18, co powoduje silną adhezję neutrofilii do komórek nabłonkowych i ich aktywację [26]. Niektóre szczepy *H. pylori* wykazują silną adhezję do powierzchni neutrofilii bez uprzedniej opsonizacji przez składniki układu dopełniacza czy przeciwciała. Adhezja ta prowadzi do fagocytozy bakterii, lecz zaobserwowano, że patogen nie jest wewnątrz komórek żernych zabijany [75]. Fagocytoza patogenu przez neutrofile prowadzi do ich silnej aktywacji i wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych ROS (reactive oxygen species). W przypadku zfagocytowania nie zopsonizowanej bakterii wolne rodniki nie są jednak kierowane do wnętrza fagolizosomu ale wydzielane na zewnątrz komórki [1, 61, 75]. Mechanizm tego unikalnego procesu polegającego na przekierowaniu aktywnej oksydazy NADPH do błony komórkowej nie został do końca wyjaśniony jednak bez sprzecznie jest on przyczyną uszkodzeń nabłonka [1, 61] i został powiązany z podwyższeniem ryzyka wystąpienia choroby wrzodowej. Mechanizm fagocytozy nieopsonizowanych komórek *H. pylori*, zależny od obecności N-acetyloneuraminooligosacharydów na powierzchni neutrofilii, jest zbliżony do przebiegu lektynofagocytozy [61, 75]. Opsonizowane bakterie są normalnie zabijane wewnątrz fagolizosomów, ale *H. pylori* jest słabo opsonizowany, przynajmniej w eksperymentach *in vitro* [8]. Podsumowując zakażenie *H. pylori*

wywołuje silną infiltrację neutrofilii do miejsca infekcji ich aktywację i adhezję do komórek nabłonka przez działanie NAP oraz gwałtowną produkcję reaktywnych form tlenu wydzielanych na zewnątrz komórki. Powodują one uszkodzenia i apoptozę komórek nabłonkowych, co skutkuje uwolnieniem do środowiska licznych składników pokarmowych i jonów wykorzystywanych przez patogen. Jednocześnie uszkodzenia komórek nabłonkowych mogą przyczyniać się do rozwoju choroby wrzodowej.

Komórki dendrytyczne będące podstawowymi komórkami prezentującymi antygeny limfocytom T (APC- antigen presenting cells) zapoczątkowują odpowiedź swoistą organizmu. Powstają jak i inne komórki żerne z komórek macierzystych szpiku kostnego, dostają się do krwioobrotu, a stamtąd do tkanek gdzie ujawnia się ich zdolność do fagocytozy. Po rozpoznaniu i sfagocytowaniu patogenu podlegają procesowi tzw. Dojrzwania, co przejawia się zwiększeniem liczby cząsteczek MHC oraz cząsteczek kostymulacyjnych na ich powierzchni, wzmożonym wydzielaniem cytokin oraz migracją do węzłów chłonnych, gdzie prezentują przetworzone antygeny limfocytom T [36]. Wytwarzane przez te komórki cytokiny decydują o różnicowaniu właściwych limfocytów helperowych (Th1 vs Th2). Mają one również zdolność do aktywacji komórek NK przez wydzielaną IL-12 [39]. Komórki dendrytyczne inkubowane z żywymi komórkami *H. pylori* oraz ekstraktem komórkowym szybko dojrzewają i produkują cytokiny (IL-12, IL-10, IL-8, IL-2 i INF- γ). Ciekawa wydaje się obserwacja, że żywe komórki *H. pylori* stymulują głównie syntezę cytokiny IL-12 indukującej odpowiedź typu Th1. Aktywacja jej produkcji jest zależna od obecności genów wyspy patogenności *cag* [38]. Specyficzna adhezyna *H. pylori* (składnik LPSu, antygen grup krwi LewisX) rozpoznaje na powierzchni komórek dendrytycznych receptor DC-SIGN (DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin), co decyduje o ukierunkowaniu odpowiedzi immunologicznej i chronicznej infekcji [3]. Podobny mechanizm oddziaływań z komórkami DC został udokumentowany także dla innych patogenów [3]. Wytwarzana przez komórki dendrytyczne IL-8 powoduje również infiltrację innych komórek układu odpornościowego do miejsca zakażenia oraz nasilenie stanu zapalnego [46].

5. Wpływ infekcji *H. pylori* na aktywność eozynofili, bazofili, komórek tucznych i komórek NK

Eozynofile to leukocyty o charakterystycznym dwupłatomym jądrze biorące udział w odpowiedzi na pasożyty oraz zakażenia wirusowe, aktywowane produkują

liczne substancje cytotoksyczne takie jak MBP (major basic protein) czy ECP (eosinophil cationic protein), które biorą udział w zabijaniu pasożytów, czy peroksydazę eozynofilową biorącą udział w niszczeniu wirusów. Nadmierna aktywacja tych komórek jest z reguły obserwowana w chorobach alergicznych [36]. Ich rola w zakażeniach *H. pylori* nie jest do końca jasna, wykazano ich infiltrację do zakażonych regionów [4] oraz wydzielanie przez nie białka kationowego (ECP), które poprzez cytotoksyczne działanie, powoduje istotne patologiczne zmiany w śluzówce.

Bazofile występują głównie w krwioobiegu. Ich funkcja w układzie odpornościowym jest podobna do komórek tucznych, choć są komórkami krócej żyjącymi i łatwiej ulegają degranulacji. Na swojej powierzchni posiadają receptory dla fragmentu Fc przeciwciał klasy IgE. Po związaniu przez te przeciwciała antygeny następuje aktywacja bazofili powodująca uwolnienie znacznych ilości histaminy – bardzo silnego mediatora stanu zapalnego. Napływanie bazofili do śluzówki żołądka wykazano u osób z rozwiniętymi objawami zakażenia *H. pylori* oraz chorobą wrzodową, nie ma ich natomiast u osób nie zainfekowanych oraz u tych pacjentów u których infekcja przebiega bezobjawowo [22]. Bakteryjny peptyd Hp(2–20) (*H. pylori*-derived peptide), wykazujący właściwości chemoatraktanta dla bazofili oraz zdolność do ich aktywacji, oddziałuje poprzez receptory zbliżone do receptorów formaldehydu (FPR)- FPRL1 i FPRL2 (FPR-Like). Związanie przez nie Hp(2–20) powoduje degranulację bazofili i uwolnienie histaminy [22]. Hp(2–20) wywołuje też pośrednio dysfunkcję i apoptozę limfocytów [9].

Komórki tuczne (MC – mast cells) odgrywają niezwykle istotną rolę w początkowych etapach odpowiedzi immunologicznej, lokalizując się w tkankach w strategicznych punktach w pobliżu naczyń krwionośnych. Charakteryzują się wysoką ekspresją genów kodujących receptory dla wzorców molekularnych i wrażliwością na cytokiny prozapalne. Aktywacja komórek tucznych czy to przez stymulację receptorów dla PAMP czy przez cytokiny wytwarzane przez inne komórki powoduje gwałtowne uwolnienie czynników prozapalnych z granul tych komórek amplifikując sygnał prozapalny i indukując odpowiedź zapalną. Uwalnianie przez nie mediatorów powodują rozluźnienie ścianek naczyń krwionośnych, napływanie i aktywację komórek stanu zapalnego. Wydzielają one również proteazy serynowe, chymazę i tryptazę odpowiadające za aktywację niektórych mediatorów stanu zapalnego np. składnika C3 dopełniacza, oraz częściową hydrolizę macierzy zewnątrzkomórkowej, co ułatwia napływanie innych komórek układu odpornościowego w miejsce stanu zapalnego, ale może też doprowadzić do poważnych uszkodzeń nabłonków w miejscu ich działania [36]. Badania wykazały, że komórki tucz-

ne, obok neutrofilów i makrofagów, aktywnie uczestniczą w rozwoju chronicznych stanów zapalnych w tym również wywołanych przez *H. pylori*, choć o ich roli w tych ostatnich wiadomo stosunkowo niewiele. Udokumentowano, że toksyna wakuolizująca VacA stanowi główny chemoatraktant dla komórek tucznych w zakażeniach *H. pylori* [70]. VacA oddziałuje bezpośrednio na MC poprzez receptor na ich powierzchni wywołując aktywację. Dłuższy kontakt komórek tucznych z VacA wywołuje ich wakuolizację i apoptozę [70]. Aktywowane przez toksynę komórki zaczynają wydzielać cytokiny takie jak: TNF- α , MIP-1 α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-13. Również białko NAP wykazuje zdolność do aktywacji MC [59]. Wykazano że komórki tuczne są obecne w stanach zapalnych górnego odcinka przewodu pokarmowego zarówno zależnych od infekcji *H. pylori* jak i od przebiegających bez udziału patogenu oraz biorą udział w rozwoju choroby wrzodowej [54]. Najważniejszymi mediatorami wydzielanymi przez komórki tuczne biorącymi udział w rozwoju chronicznych zapaleń śluzówki żołądka związanych z *H. pylori* są prawdopodobnie proteazy serynowe chymaza i tryptaza [51]. Nagromadzeniu komórek tucznych w ścianach żołądka towarzyszy wydzielanie dużych ilości tryptazy stanowiącej czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów i innych komórek stanu zapalnego [42, 79]. Wydzielana przez MC chymaza, której nadmierną aktywność wykazano w wielu chorobach związanych z występowaniem chronicznych stanów zapalnych [53, 58, 81] również wykazuje właściwości chemoatraktanta dla monocytów i neutrofilów [73].

Komórki NK (natural killers) są dużymi ziarnistymi leukocytami o charakterystycznym nerkowatym jądrze wykazującymi silne własności cytotoksyczne. Odgrywają one istotną rolę w obronie przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. Zabijają komórki bezpośrednio tworząc synapsę immunologiczną z komórką docelową (np. zakażoną wirusem) i uwalniając do niej perforyny i granzymy zmagazynowane w ziarnach. Oddziałują również poprzez tzw. „receptory śmierci” Fas/FasL. Na ich powierzchni występują receptory dla fragmentu Fc przeciwciał biorące udział w ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Komórki NK aktywowane są również przez IL-12 oraz interferony, a działanie hamujące na nie wykazują prostaglandyny E. Aktywowane komórki NK wydzielają INF- γ , który jest ważnym mediatorem stanu zapalnego i ma zdolność do aktywacji wielu komórek układu odpornościowego oraz procesów fagocytozy i prezentacji antygenów [36]. Duże stężenia INF- γ wykazano w zakażeniach *H. pylori*. W doświadczeniach *in vitro* zarówno żywa bakteria jak i lizat komórkowy mają zdolność do indukcji wytwarzania INF- γ przez komórki NK [84]. Aktywacja komórek NK i ich cytotoksyczna działalność jest prawdopodobnie jedną z przyczyn

uszkodzeń tkanki w zakażeniach *H. pylori*. Choć komórki te z reguły aktywowane są przez zmniejszenie lub brak ekspresji MHC klasy I na komórkach docelowych, mogą być również aktywowane przez czynniki bakteryjne (poprzez receptory dla wzorców molekularnych) i wytwarzaną w zakażeniach IL-12. Komórki NK różnią się ekspresją markera powierzchniowego CD56. Są nimi: NK CD56^{dim} o niskiej ekspresji CD56, charakteryzujące się wysoką cytotoxycnością oraz NK CD56^{bright} o wysokim poziomie wytwarzania CD56, które stanowią głównych producentów INF- γ . Te drugie mają ograniczoną zdolność do zabijania komórek [16, 20]. Zaobserwowano, że inkubacja NK z *H. pylori* powoduje zwiększenie ekspresji genu kodującego receptor dla IL-12 na powierzchni NK CD56^{bright} ale nie na powierzchni NK CD56^{dim} [84] co sprawia że w następuje silniejsza aktywacja komórek produkujących INF- γ natomiast komórki silnie cytotoxyczne są aktywowane w mniejszym stopniu. Choć mechanizm tego procesu nie został wyjaśniony może on odgrywać bardzo ważną rolę w patogenezie *H. pylori* oraz rozwoju choroby wrzodowej, gdyż nadmierne wydzielanie INF- γ przez komórki NK powoduje nadmierną aktywację komórek takich jak neutrofile i makrofagi oraz może prowadzić do powstania autoaktywnych klonów limfocytów T cytotoxycznych, a co za tym idzie do poważnych uszkodzeń błony śluzowej żołądka [23, 74].

6. Podsumowanie

H. pylori wywołuje chroniczne infekcje dzięki zdolności do unikania zarówno wrodzonej jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Mechanizmy odpowiedzi wrodzonej są nieskuteczne, gdyż patogen unika rozpoznania przez receptory wzorców molekularnych oraz moduluje odpowiedź komórek nabłonkowych; wywołuje dysfunkcję i apoptozę makrofagów i neutrofile, a także wpływa na aktywność innych komórek zaangażowanych w przebieg procesów zapalnych. Chroniczna aktywacja układu odpornościowego prowadzi do uszkodzeń tkanki nabłonkowej i choroby wrzodowej, a w skrajnych przypadkach nawet raka żołądka. Ten unikalny system utrzymywania chronicznego stanu zapalnego śluzówki jest intensywnie badany w laboratoriach mikrobiologicznych na całym świecie, dzięki czemu, zaczynamy dokładniej rozumieć przebieg procesów odpornościowych jakie towarzyszą infekcji *H. pylori*. Dogłębne poznanie czynników w nie zaangażowanych może prowadzić do wytworzenia nowych, skuteczniejszych leków i szczepionki przeciw *H. pylori* oraz może dostarczyć wielu informacji na temat funkcjonowania układu odpornościowego błon śluzowych naszego organizmu. Opraco-

wanie skutecznych metod profilaktycznych anty-*Helicobacter* będzie wymagało zrozumienia działania odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza indukowanej infekcją (Th1 vs Th2) oraz opracowania wiarygodnego zwierzęcego modelu badawczego. Jak do tej pory większość prototypów szczepionek indukujących głównie Th2 typ odpowiedzi immunologicznej testowanych na modelu mysim okazała się nieskuteczna po podaniu ludziom.

Piśmiennictwo

1. Allen L.A., Beecher B.R., Lynch J.T., Rohner O.V., Wittine L.M.: *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J. Immunol.* **174**, 3658–3667 (2005)
2. Alm R.A., Trust T.J.: Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J. Mol. Med.* **77**, 834–846 (1999)
3. Appelmeik B.J., van Die I., van Vliet S.J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Geijtenbeek T.B., van Kooyk Y.: Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J. Immunol.* **170**, 1635–1639 (2003)
4. Aydemir S.A., Tekin I.O., Numanoglu G., Borazan A., Ustundag Y.: Eosinophil infiltration, gastric juice and serum eosinophil cationic protein levels in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and gastric ulcer. *Mediators Inflamm.* **13**, 369–372 (2004)
5. Backhed 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.* **71**, 3357–3360 (2003)
6. Basak C., Pathak S.K., Bhattacharyya A., Mandal D., Pathak S., Kundu M.: NF- κ B- and C/EBP β -driven Interleukin-1 β Gene Expression and PAK1-mediated Caspase-1 Activation Play Essential Roles in Interleukin-1 β Release from *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages. *J. Biol. Chem.* **280**, 4279–4288 (2005)
7. Basu M., Czinn S.J., Blanchard T.G.: Absence of catalase reduces long-term survival of *Helicobacter pylori* in macrophage phagosomes. *Helicobacter*, **9**, 211–216 (2004)
8. Berstad A.E., Brandtzaeg P., Stave R., Halstensen T.S.: Epithelium related deposition of activated complement in *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut*, **40**, 196–203 (1997)
9. Betten A., Bylund J., Christophe T., Boulay F., Romero A., Hellstrand K., Dahlgren C.: A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Inv.* **108**, 1221–1228 (2001)
10. Bjorkholm B., Sjolund M., Falk P.G., Berg O.G., Engstrand L., Andersson D.I.: Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14607–14612 (2001)
11. Bliss C.M., Jr., Golenbock D.T., Keates S., Linevsky J.K., Kelly C.P.: *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemoattractant protein 1 by human monocytes. *Infect. Immun.* **66**, 5357–5363 (1998)

12. Boneca I.G.: The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 46–53 (2005)
13. Bury-Mone S., Skouloubris S., Labigne A., De Reuse H.: The *Helicobacter pylori* UreI protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol. Microbiol.* **42**, 1021–1034 (2001)
14. Bussiere F.I., K.T. Wilson i wsp.: Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J. Biol. Chem.* **280**, 2409–2412 (2005)
15. Carneiro L.A., Travassos L.H., Philpott D.J.: Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect.* **6**, 609–616 (2004)
16. Carson W.E., Fehniger T.A., Caligiuri M.A.: CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur. J. Immunol.* **27**, 354–360 (1997)
17. Chaturvedi R., Cheng Y., Asim M., Bussiere F.I., Xu H., Gobert A.P., Hacker A., Casero R.A., Jr., Wilson K.T.: Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* **279**, 40161–40173 (2004)
18. Cheng Y., Chaturvedi R., Asim M., Bussiere F.I., Scholz A., Xu H., Casero R.A., Jr., Wilson K.T.: *Helicobacter pylori*-induced macrophage apoptosis requires activation of ornithine decarboxylase by c-Myc. *J. Biol. Chem.* **280**, 22492–22496 (2005)
19. Clyne M., Labigne A., Drumm B.: *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect. Immun.* **63**, 1669–1673 (1995)
20. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, **22**, 633–640 (2001)
21. Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R.: *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, **284**, 1328–1333 (1999)
22. de Paulis A., Prevete N., Fiorentino L., Walls A.F., Curto M., Petraroli A., Castaldo V., Ceppa P., Fiocca R., Marone G.: Basophils infiltrate human gastric mucosa at sites of *Helicobacter pylori* infection, and exhibit chemotaxis in response to *H. pylori*-derived peptide Hp(2–20). *J. Immunol.* **172**, 7734–7743 (2004)
23. Dohlsten M., Hedlund G., Kalland T.: Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today*, **12**, 147–150 (1991)
24. Eaton K.A., Brooks C.L., Morgan D.R., Krakowka S.: Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**, 2470–2475 (1991)
25. Eaton K.A., Krakowka S.: Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**, 3604–3607 (1994)
26. Evans D.J., Jr., Evans D.G., Takemura T., Nakano H., Lampert H.C., Graham D.Y., Granger D.N., Kviety P.R.: Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* **63**, 2213–2220 (1995)
27. Falush D., Kraft C., Taylor N.S., Correa P., Fox J.G., Achtman M., Suerbaum S.: 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 (2001)
28. Fischer W., Puls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., Haas R.: Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**, 1337–1348 (2001)
29. Gewirtz A.T., Yu Y., Krishna U.S., Israel D.A., Lyons S.L., Peek R.M., Jr.: *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J. Infect. Dis.* **189**, 1914–1920 (2004)
30. Girardin S.E., D.J. Philpott i wsp.: Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, **300**, 1584–1587 (2003)
31. Girardin S.E., D.J. Philpott i wsp.: CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Reports*, **2**, 736–742 (2001)
32. Gobert A.P., Bambou J.C., Werts C., Balloy V., Chignard M., Moran A.P., Ferrero R.L.: *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 245–250 (2004)
33. Gobert A.P., Cheng Y., Wang J.Y., Boucher J.L., Iyer R.K., Cederbaum S.D., Casero R.A., Jr., Newton J.C., Wilson K.T.: *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J. Immunol.* **168**, 4692–4700 (2002)
34. Gobert A.P., McGee D.J., Akhtar M., Mendz G.L., Newton J.C., Cheng Y., Mobley H.L., Wilson K.T.: *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13844–13849 (2001)
35. Godlewska R., Pawlowski M., Dzwonek A., Mikula M., Ostrowski J., Drela N., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Tip-alpha (hp0596 Gene Product) Is a Highly Immunogenic *Helicobacter pylori* Protein Involved in Colonization of Mouse Gastric Mucosa. *Current Microbiology*, **56**, 279–286 (2008)
36. Gołab J., Jakóbiński M., Lasek W. (red.): Immunologia, Wyd. Naukowe PWN, 2005
37. Graham J.E., Peek R.M., Jr., Krishna U., Cover T.L.: Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterol.* **123**, 1637–1648 (2002)
38. Guiney D.G., Hasegawa P., Cole S.P.: *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect. Immun.* **71**, 4163–4166 (2003)
39. Hafsi N., Voland P., Schwendy S., Rad R., Reindl W., Gerhard M., Prinz C.: Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J. Immunol.* **173**, 1249–1257 (2004)
40. Hansen P.S., Petersen S.B., Varning K., Nielsen H.: Additive effects of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and proteins in monocyte inflammatory responses. *Scand. J. Gastroenterology*, **37**, 765–771 (2002)
41. Harris P.R., Smythies L.E., Smith P.D., Dubois A.: Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* **181**, 783–786 (2000)
42. He S., Peng Q., Walls A.F.: Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate *in vivo* by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J. Immunol.* **159**, 6216–6225 (1997)
43. Inohara N., Nunez G.: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 371–382 (2003)
44. Ishihara S., Rumi M.A., Kadowaki Y., Ortega-Cava C.F., Yuki T., Yoshino N., Miyaoka Y., Kazumori H., Ishimura N., Amano Y., Kinoshita Y.: Essential role of MD-2 in TLR4-

- dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J. Immunol.* **173**, 1406–1416 (2004)
45. Kavermann H., Burns B.P., Angermuller K., Odenbreit S., Fischer W., Melchers K., Haas R.: Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J. Exp. Med.* **197**, 813–822 (2003)
46. Kranzer K., Eckhardt A., Aigner M., Knoll G., Deml L., Speth C., Lehn N., Rehli M., Schneider-Brachert W.: Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **72**, 4416–4423 (2004)
47. Kuzuhara T., Suganuma M., Kurusu M., Fujiki H.: *Helicobacter pylori*-secreting protein Tipalpha is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **133**, 287–296 (2007)
48. Lee S.K., Josenhans C.: *Helicobacter pylori* and the innate immune system. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**, 325–334 (2005)
49. Maeda S., Akanuma M., Mitsuno Y., Hirata Y., Ogura K., Yoshida H., Shiratori Y., Omata M.: Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 44856–44864 (2001)
50. Mandell L., Moran A.P., Cocchiarella A., Houghton J., Taylor N., Fox J.G., Wang T.C., Kurt-Jones E.A.: Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* **72**, 6446–6454 (2004)
51. Matsuo T., Ikura Y., Ohsawa M., Ogami M., Kayo S., Yoshimi N., Hai E., Naruko T., Ohishi M., Higuchi K., Arakawa T., Ueda M.: Mast cell chymase expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Histopathology*, **43**, 538–549 (2003)
52. Menaker R.J., Ceponis P.J., Jones N.L.: *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. *Infect. Immun.* **72**, 2889–2898 (2004)
53. Mitani Y., Ueda M., Maruyama K., Shimpo H., Kojima A., Matsumura M., Aoki K., Sakurai M.: Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax*, **54**, 88–90 (1999)
54. Nakajima S., Krishnan B., Ota H., Segura A.M., Hattori T., Graham D.Y., Genta R.M.: Mast cell involvement in gastritis with or without *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, **113**, 746–754 (1997)
55. Nguyen T.N., Barkun A.N., Fallone C.A.: Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter*, **4**, 185–197 (1999)
56. Obonyo M., Guiney D.G., Fierer J., Cole S.P.: Interactions between inducible nitric oxide and other inflammatory mediators during *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **8**, 495–502 (2003)
57. Odenbreit S., Gebert B., Puls J., Fischer W., Haas R.: Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* **3**, 21–31 (2001)
58. Ohishi M., Ueda M., Rakugi H., Naruko T., Kojima A., Okamura A., Higaki J., Ogihara T.: Relative localization of angiotensin-converting enzyme, chymase and angiotensin II in human coronary atherosclerotic lesions. *J. Hypertens.* **17**, 547–553 (1999)
59. Olivares D., Gisbert J.P.: Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **98**, 374–386 (2006)
60. Ramarao N., Gray-Owen S.D., Backert S., Meyer T.F.: *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Mol. Microbiol.* **37**, 1389–1404 (2000)
61. Rautelin H., von Bonsdorff C.H., Blomberg B., Danielsson D.: Ultrastructural study of two patterns in the interaction of *Helicobacter pylori* with neutrophils. *J. Clin. Pathol.* **47**, 667–669 (1994)
62. Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F.: A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 588–593 (1998)
63. Schmausser B., Andrusis M., Endrich S., Lee S.K., Josenhans C., Muller-Hermelink H.K., Eck M.: 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 (2004)
64. Schreiber S., Konradt M., Groll C., Scheid P., anauer G., Werling H.O., Josenhans C., Suerbaum S.: The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5024–5029 (2004)
65. Smith M.F., Jr., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A.M., Ryan K., Crowe S.E., Goldberg J.B.: TLR2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 32552–32560 (2003)
66. Su B., Ceponis P.J., Lebel S., Huynh H., Sherman P.M.: *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **71**, 3496–3502 (2003)
67. Suerbaum S.: *Helicobacter pylori*-23 years on. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**, 297–298 (2005)
68. Suerbaum S., J.G. Fox i wsp.: The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7901–7906 (2003)
69. Suganuma M., Kurusu M., Suzuki K., Nishizono A., Murakami K., Fujioka T., Fujiki H.: New tumor necrosis factor-alpha-inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **131**, 305–313 (2005)
70. Supajatura V., Ushio H., Wada A., Yahiro K., Okumura K., Ogawa H., Hirayama T., Ra C.: Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* **168**, 2603–2607 (2002)
71. Takenaka R., Yokota K., Ayada K., Mizuno M., Zhao Y., Fujinami Y., Lin S.N., Toyokawa T., Okada H., Shiratori Y., Oguma K.: *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiol.* **150**, 3913–3922 (2004)
72. Takeshita F., Gursel I., Ishii K.J., Suzuki K., Gursel M., Klinman D.M.: Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin. Immunol.* **16**, 17–22 (2004)
73. Tani K., Ogushi F., Kido H.: Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 585–589 (2000)
74. Tarkkanen J., Kosunen T.U., Saksela E.: Contact of lymphocytes with *Helicobacter pylori* augments natural killer cell activity and induces production of gamma interferon. *Infect. Immun.* **61**, 3012–3016 (1993)
75. Teneberg S., Jurstrand M., Karlsson K.A., Danielsson D.: Inhibition of nonopsonic *Helicobacter pylori*-induced activation of human neutrophils by sialylated oligosaccharides. *Glycobiology*, **10**, 1171–1181 (2000)

76. Tomb J.F., J.C. Venter i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **338**, 539–543 (1997)
77. Viala J., R.L. Ferrero i wsp.: Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature Immun.* **5**, 1166–1174 (2004)
78. Vitkute J., Stankevicius K., Tamulaitiene G., Maneliene Z., Timinskas A., Berg D.E., Janulaitis A.: Specificities of eleven different DNA methyltransferases of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J. Bacteriol.* **183**, 443–450 (2001)
79. Walls A.F., He S., Teran L.M., Buckley M.G., Jung K.S., Holgate S.T., Shute J.K., Cairns J.A.: Granulocyte recruitment by human mast cell tryptase. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **107**, 372–373 (1995)
80. Watson R.O., Galan J.E.: Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. *Cell. Microbiol.* **7**, 655–665 (2005)
81. Yamada M., Ueda M., Naruko T., Tanabe S., Han Y.S., Ikura Y., Ogami M., Takai S., Miyazaki M.: Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int.* **59**, 1374–1381 (2001)
82. Yamaoka Y., Kita M., Kodama T., Sawai N., Imanishi J.: *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*, **110**, 1744–1752 (1996)
83. Yoshida M., Wakatsuki Y., Kobayashi Y., Itoh T., Murakami K., Mizoguchi A., Usui T., Chiba T., Kita T.: Cloning and characterization of a novel membrane-associated antigenic protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **67**, 286–293 (1999)
84. Yun C.H., Lundgren A., Azem J., Sjolting A., Holmgren J., Svennerholm A.M., Lundin B.S.: Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. *Infect. Immun.* **73**, 1482–1490 (2005)
85. Zheng P.Y., Jones N.L.: *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell. Microbiol.* **5**, 25–40 (2003)