

## **Wpływ bakterii kwasu mlekowego na reakcje odpornościowe indukowane przez *H. pylori* na modelu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej**

### **STRESZCZENIE**

Generalnie, reakcje odpornościowe indukowane przez *H. pylori* wykazują działania tolerogenne, sprzyjające przetrwaniu infekcji przy jednoczesnym utrzymywaniu się szeregu reaktywności prozapalnych zarówno lokalnych jak i systemowych. Przypuszcza się, że znaczącą rolę w kontrolowaniu profilu reakcji odpornościowych na zakażenie *H. pylori* odgrywa mikroflora jelitowa, w tym pałeczki kwasu mlekowego – lactobacilli (LAB). Różne szczepy LAB kolonizują błonę śluzową żołądka, zmniejszając poziom kolonizacji *H. pylori* oraz modulują reakcje odpornościowe indukowane *H. pylori*. Probiotyki, w tym niektóre szczepy LAB zwiększają skuteczność klasycznej terapii eradycyjnej poprzez indukowanie bardziej protekcyjnych reakcji odpornościowych, sprzyjających eliminacji infekcji i przy jednoczesnym łagodzeniu patogenicznych reaktywności prozapalnych. Mechanizmy modulacji przez bakterie probiotyczne reakcji odpornościowych indukowanych przez pałeczki *H. pylori* pozostają niewyjaśnione.

W pracy wykorzystano model badawczy, w którym oceniano profil reaktywności komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) zdrowych dawców krwi. Populacja PBMC zawiera około 80% limfocytów i 20% monocytów. Limfocyty populacji PBMC wykazują reaktywność wobec antygenów mikroflory jelitowej, w tym *H. pylori* i LAB stąd możliwe jest określenie wzajemnego wpływu tych bakterii na wybrane parametry odpornościowe *in vitro*.

Określano reaktywność PBMC w odpowiedzi na stymulację przez a) pałeczki *H. pylori* (szczep Cag+), b) *L. plantarum* szczep 0862 (antagonistyczny względem *H. pylori*) oraz *L. plantarum* szczep 0864 (nieantagonistyczny wobec *H. pylori*), c) mieszaninę trzech szczepów LAB pod postacią preparatu probiotycznego (TRILAC), antagonistycznego wobec *H. pylori*, d) pałeczki *H. pylori* w kombinacji z w/wymienionymi szczepami LAB.

Badania prowadzono w hodowlach 7-dniowych (odpowieź swoista limfocytów T na antygeny mikroflory), oraz w hodowlach 3-dniowych, (poliklonalna aktywacja limfocytów T stymulowanych *via* receptor CD3).

Określano następujące parametry odpowiedzi immunologicznej: a) proliferacja PBMC (oceniana techniką inkorporacji trytowanej tymidyny), b) proliferacja subpopulacji limfocytów T (CD4+, CD8+) oraz limfocytów B (CD19+), techniką cytometryczną, c) profil

syntezy cytokin (IL-12p40, IL-12p70, IL-23, IL-27, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) w nadsączach z hodowli komórkowych, techniką immunoenzymatyczną ELISA.

W populacji PBMC indukowanych przeciwciałami anti-CD3 analizowano wpływ *H. pylori*, LAB oraz LAB/*H. pylori* na: poziom apoptozy PBMC, b) profil ekspresji receptorów monocytarnych uczestniczących w procesie prezentacji antygenów limfocytom T (HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD54), c) poziom limfocytów Treg. Wszystkie te oznaczenia wykonywano techniką cytometrii przepływowej.

Badane szczepy LAB, pałeczki *H. pylori* oraz *H. pylori* w kombinacji z LAB nie różniły się znacząco w zakresie indukcji proliferacji swoistej w hodowlach 7-dniowych. Badane szczepy LAB nie zmieniały także znacząco proliferacji indukowanej przez pałeczki *H. pylori*.

Przeciwnie, pałeczki *H. pylori*, szczepy LAB oraz szczepy LAB w kombinacji z *H. pylori* silnie blokowały proliferację nieswoistą limfocytów, stymulowanych przeciwciałami anti-CD3. Najsilniejszy efekt supresyjny indukowany był przez kombinację *H. pylori* ze szczepem nieantagonistycznym *L. plantarum* szczep 0864, a najslabszy z preparatem probiotycznym TRILAC. Supresja proliferacji dotyczyła limfocytów T CD4+, a w przypadku *H. pylori*, *L. plantarum* szczep 0864 i kombinacji *H. pylori* ze szczepami *L. plantarum*, również limfocytów T cytotoksycznych (CD8+). Supresja proliferacji związana była ze spadkiem ekspresji szeregu cząsteczek adhezyjnych i kostymulacyjnych monocytów, zaangażowanych w przekazywaniu sygnału II aktywacji limfocytów T, lecz nie ze wzrostem populacji limfocytów Treg lub apoptozą komórek.

Badane szczepy LAB oraz pałeczki *H. pylori* indukowały silną odpowiedź cytokinową w populacji PBMC. Generalnie, LAB jako szczepy Gram-dodatnie indukowały wysoki poziom IFN- $\gamma$  oraz IL-12p40, lecz relatywnie niski poziom IL-10, z wyjątkiem preparatu TRILAC który był silnym stymulatorem tej cytokiny.

Przeciwnie, *H. pylori* jako bakteria Gram-ujemna indukowała niższy poziom IL-12p40 oraz IFN- $\gamma$  lecz wysoki IL-10 w porównaniu do stosowanych szczepów LAB (z wyjątkiem preparatu TRILAC). Najbardziej charakterystycznym efektem kombinacji *H. pylori* oraz szczepów LAB w układzie odpowiedzi swoistej było zmniejszanie indukowanej LAB produkcji IL-12p40, przy wzroście produkcji IL-10. Efekt ten był najslabszy w kombinacji *H. pylori* /TRILAC.

Generalnie, uzyskane wyniki wskazują, że bakterie kwasu mlekowego wpływają zdecydowanie na profil reakcji odpornościowych indukowanych *H. pylori*, zwłaszcza w zakresie cytokin istotnych w procesie eliminacji infekcji, tj. IL-12p40, IFN- $\gamma$  (zwiększają

komórkowe reakcje cytotoksyczne i efektywność fagocytozy) przy jednoczesnym utrzymywaniu odpowiedniego poziomu cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-10.

Klasyczne probiotyki (tutaj preparat TRILAC) znacząco zmniejszają tolerogenne działania *H. pylori* ponieważ ograniczają hamowanie produkcji IFN- $\gamma$  oraz IL-12p40) przy jednoczesnym utrzymywaniu aktywności przeciwzapalnych (IL-10 oraz IL-27).

Kubinec Kabela