



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη των Εξωκυττάρων Ουδετεροφιλικών Δικτύων Χρωματίνης (Neutrophil  
Extracellular Traps) στη λοίμωξη από *Helicobacter pylori*»**

**ΠΕΤΡΟΥ ΕΛΕΝΗ**

Γεωπόνος

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:**

Κόλλια Παναγούλα, Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Αθήνα, 2022





**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ**  
**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ**  
**ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ & ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ**



**ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ**  
**INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE**

**ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ:**

**Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ**

**Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Διονύσιος Σγούρας, Διευθυντής Ερευνών**

**Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ**

**Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Κωνσταντίνος Καμπάς, Κύριος Ερευνητής**

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη των Εξωκυττάρων Ουδετεροφιλικών Δικτύων Χρωματίνης (Neutrophil Extracellular Traps) στη λοίμωξη από *Helicobacter pylori*»**

**ΠΕΤΡΟΥ ΕΛΕΝΗ**

Γεωπόνος, ΑΜ: 7113042000009

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

**Κόλλια Παναγούλα**, Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

**Σγούρας Διονύσιος**, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ε.Ι. Παστέρ

**Σαμαρά Μαρία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αθήνα, 2022

## Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος της συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας σηματοδοτείται η αποπεράτωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ένα ταξίδι πολύ ενδιαφέρον και όμορφο, που με γέμισε με πολλές γνώσεις και εμπειρίες στο δρόμο της επιστήμης.

Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα κ. Διονύση Σγούρα, Διευθυντή Ερευνών στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και μου έδωσε την ευκαιρία σε αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα να ασχοληθώ με αυτό το ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα και να ανοίξω τους ορίζοντες μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα της παρούσας εργασίας κ. Κωνσταντίνο Καμπά, Κύριο Ερευνητή του Εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την συνεχή καθοδήγηση του, την γνώση και την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε, τον χρόνο που μου διέθετε, την υπομονή του και την στήριξη του ώστε να κατανοήσω και να μελετήσω το παρόν θέμα, να ξεπεράσω τις δυσκολίες και το άγχος της μελέτης και να καταφέρω να ολοκληρώσω την διπλωματική μου εργασία.

Ευχαριστώ πολύ την επιβλέπουσα κα. Παναγούλα Κόλλια, καθηγήτρια Βιολογίας του ΕΚΠΑ, για την βοήθειά της στην επιλογή του παρόντος θέματος και την κα. Σαμαρά Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το χρόνο που αφιέρωσαν να μελετήσουν την εργασία μου.

Θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες σε όλη την επιστημονική ερευνητική ομάδα και κυρίως στους διδακτορικούς φοιτητές Γιάννη Καραγιάννη και Σταύρο Ναούμ για την πολύτιμη βοήθεια τους για την διεξαγωγή της πειραματικής έρευνας, για την συμπαράσταση τους και την όμορφη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη την διάρκεια παραμονής μας στα εργαστήρια. Στο ίδιο πλαίσιο ευχαριστώ τον συμφοιτητή μου Γιώργο Γεωργούλια, μεταπτυχιακό φοιτητή, για την αλληλοστήριξη και αλληλοβοήθεια. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Δρ Beatriz Martinez-Gonzalez για τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές της.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους που βοήθησαν με κάθε τρόπο στην διεξαγωγή αυτής της έρευνας καθώς επίσης και την κα Δήμητρα Αναγνωστοπούλου, γραμματέα του ΔΠΜΣ για την ενεργό συμμετοχή της καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Τέλος, θέλω να εκφράσω βαθύτατες ευχαριστίες στους γονείς μου, τον αδερφό μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την ψυχολογική και όχι μόνο υποστήριξη τους σε όλο το διάστημα των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
Ευχαριστίες.....	4
Συντμήσεις.....	7
Περίληψη.....	9
Abstract.....	11
A. Εισαγωγή.....	13
1. Ελικοβακτήριο του πυλωρού ( <i>Helicobacter pylori</i> - <i>H. pylori</i> ).....	14
1.1 Ιστορική Αναδρομή του <i>H. pylori</i> .....	15
1.2 Ταξινόμηση και Φυλογενετική Οργάνωση.....	16
1.3 Μορφολογία και Φυσιολογία του <i>H. pylori</i> .....	19
1.4 Επίπτωση στην Δημόσια Υγεία και ανθρώπινες μεταναστεύσεις.....	21
1.5 Μετάδοση.....	23
1.6 Γενετική ποικιλομορφία.....	24
1.7 Συμπτώματα και κλινική εικόνα της λοίμωξης από <i>H. pylori</i> .....	25
1.7.1 Οξεία Γαστρίτιδα.....	26
1.7.2 Χρόνια Γαστρίτιδα.....	27
1.7.3 Πεπτικό Έλκος.....	29
1.7.4 Γαστρικός Καρκίνος.....	29
1.7.5 Λέμφωμα MALT.....	31
1.8 Διάγνωση.....	32
1.9 Θεραπεία.....	32
1.10 Παθογένεια και Παράγοντες Παθογένειας του <i>H. pylori</i> .....	34
1.10.1 Νησίδιο Παθογένειας <i>cag</i> ( <i>cagPAI</i> ) και Ενδοτοξίνη CagA.....	37
1.10.2 Εξωτοξίνη VacA.....	42
2. Ανοσοποιητικό Σύστημα.....	44
2.1 Ανοσιακή Απόκριση και Ανοχή έναντι του <i>H. pylori</i> .....	44
2.2 Ουδετερόφιλα Κύτταρα.....	48
2.3 Εξωκυττάρια Δίκτυα Ινιδίων Χρωματίνης (NETs).....	53
2.3.1 Μονοπάτια σηματοδότησης των NETs.....	55
2.3.2 Ρύθμιση των NETs.....	58
2.3.3 Τα NETs σε άλλες ασθένειες.....	58
3. Σκοπός της εργασίας.....	63
B. Πειραματικό Μέρος/ Μεθοδολογία.....	64
4. Υλικά και Μέθοδοι.....	65
4.1 Χειρισμός βακτηριακών στελεχών <i>H. pylori</i> .....	65

4.1.1 Καλλιέργεια στελεχών <i>H. pylori</i> .....	65
4.1.2 Κρύο-συντήρηση στελεχών <i>H. pylori</i> .....	65
4.1.3 Στελέχη <i>H. pylori</i> που χρησιμοποιήθηκαν .....	65
4.1.4 Απομόνωση γενωμικού DNA στελέχους Hp981 από στερεή καλλιέργεια .....	66
4.1.5 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τον προσδιορισμό του αριθμού των EPIYA-C επαναλήψεων στην πρωτεΐνη CagA .....	66
4.1.6 Σήμανση <i>H. pylori</i> με CFDA-SE .....	68
4.2. Επικάλυψη καλυπτρίδων με διάλυμα poly-L λυσίνης.....	68
4.3 Απομόνωση Υγιούς Ανθρώπινου Ορού (Healthy Human Serum).....	68
4.4 Πειράματα Ανίχνευσης Φαγοκυττάρωσης και Απεικόνισης Εξωκυττάρων Δικτύων Χρωματίνης (NETs) .....	69
4.4.1 Απομόνωση Ουδετερόφιλων.....	69
4.4.2 Μόλυνση Ουδετερόφιλων κυττάρων με στελέχη <i>H. pylori</i> .....	71
4.4.3 Ανίχνευση φαγοκυττάρωσης και δημιουργίας NETs με ανοσοφθορισμό .....	72
4.5 Προσδιορισμός επιπέδων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS).....	74
5. Στατιστική Ανάλυση.....	75
Γ. Αποτελέσματα .....	76
6.1 Υπολογισμός του αριθμού EPIYA-C επαναλήψεων κλινικού στελέχους 981 .....	76
6.2 Τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τα βακτηριακά στελέχη <i>H. pylori</i> έπειτα από οψωνοποίηση.....	77
6.3 Τα ουδετερόφιλα παράγουν ROS ύστερα από φαγοκυττάρωση των βακτηρίων <i>H. pylori</i> .	78
6.4 Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ασταθή NETs έναντι του <i>H. pylori</i> .....	79
Δ. Συζήτηση.....	81
ΣΤ. Βιβλιογραφία .....	86

## Συντμήσεις

AlpA	Adherence associated lipoprotein A (Λιποπρωτεΐνη A που σχετίζεται με την προσκόλληση)
AlpB	Adherence associated lipoprotein B (Λιποπρωτεΐνη B που σχετίζεται με την προσκόλληση)
Atg16L1	Autophagy Related 16 Like 1 (gene)
BabA	Blood-group-Antigen-Binding Adhesion
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CagA	Cytotoxin-associated gene A
cagPAI	cytotoxin associated gene Pathogenicity Island (Νησίδιο Παθογένειας)
CGD	Chronic granulomatous disease (χρόνια κοκκιοματώδης νόσος)
citH3	Citrullinated Histone H3 (κιτρουλλινοποιημένη Ιστονή 3)
CFU	Colony Forming Units
CYP2C19	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Erk	External signal-regulated kinase
FAK	Focal Adhesion tyrosine Kinase
GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HLA	Human Leukocyte Antigen
HomB	<i>Helicobacter pylori</i> outer membrane protein B
HopZ	<i>Helicobacter pylori</i> outer membrane protein Z (πρωτεΐνη μεταβαλλόμενης φάσης)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (μόριο προσκόλλησης)
IFN-γ	Interferon gamma
IL-1	Interleukin 1
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-11	Interleukin 11
IL-13	Interleukin 13
IL-17	Interleukin 17
IL-18	Interleukin 18
IL-37	Interleukin 37
LAMP-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	gastric Mucosa-associated Lymphoid Tissue (lymphoma).
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase



MLST	Multi Locus Sequence Typing
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
MPO	Μυελούπεροξειδάση
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
Nod1	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1 (παράγοντας αναγνώρισης ενδοκυτταρικών μοτίβων)
Nod2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (παράγοντας αναγνώρισης ενδοκυτταρικών μοτίβων)
IO <sub>2</sub>	Μονήρες οξυγόνο
OipA	Outer inflammatory protein A
PAD-4	Peptidyl arginine deiminase 4
PARs	Protease-activated receptors
PAR1	Protease-activated receptor 1
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMNs	Polymorphonuclear leukocytes
PPI	Proton pump inhibitor
PRR	Pattern recognition receptors
<i>PTPN11</i>	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11 (gene)
RNS	Reactive Nitrogen Species (Δραστικές ρίζες Αζώτου)
ROS	Reactive Oxygen Species (Δραστικές ρίζες Οξυγόνου)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RUT	Rapid Urease Testing
SabA	Sialic acid binding Adhesion. (Διαμεσολαβεί τη σύνδεση με γλυκοσυζεύγματα που περιέχουν σιαλικό οξύ)
SHP-2	Src Homology Phosphatase-2
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T4SS	Type IV Secretion System (Εκκριτικό Σύστημα τύπου IV)
TF	Tissue Factor- Ιστικός παράγοντας
TH	T helper (T- βοηθητικά κύτταρα)
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR5	Toll-like receptor 5
TNF	Tumor Necrosis Factor
UBT	Urea Breathe Test
VacA	Vacuolating cytotoxin A
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule (Μόριο προσκόλλησης)
VGF	Virtual Hybridization Technique

## Περίληψη

Το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο που αποικίζει τον γαστρικό βλεννογόνο και μεσοσταθμικά προσβάλλει περισσότερο από το 50% του πληθυσμού παγκοσμίως. Η *H. pylori* λοίμωξη, έχει συσχετισθεί με την επαγωγή χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας και δωδεκαδακτυλικού έλκους και αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Η πρωτεΐνη CagA αποτελεί σημαντικό λοιμοτοξικό παράγοντα του βακτηρίου και η παθογόνος δράση της ρυθμίζεται εν μέρει από την φωσφορυλίωση της σε κατάλοιπα τυροσίνης τα οποία μετέχουν σε καρβόξυ-τελικές επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές ομάδες της μορφής EPIYA. Κατά την διάρκεια της *H. pylori* λοίμωξης, τα πρώτα κύτταρα τα οποία στρατολογούνται είναι τα ουδετερόφιλα. Διεισδύουν στο χόριο του βλεννογόνου και αποτελούν σήμα κατατεθέν της *H. pylori* λοίμωξης, προκαλώντας τοπική διήθηση και φλεγμονή. Τα ουδετερόφιλα έχουν αντιμικροβιακή δράση καθώς μέσω της φαγοκυττάρωσης και της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) σκοτώνουν τα μικρόβια μέσα στο φαγόσωμα, απελευθερώνοντας αντιμικροβιακές πρωτεΐνες μέσω της αποκοκκίωσης. Ένας τρίτος αντιμικροβιακός τους μηχανισμός είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν εξωκυττάρια δίκτυα χρωματίνης (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα NETs αποτελούνται από αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη και πρωτεΐνες των κοκκίων και του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων κυττάρων, όπως είναι η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) και η κιτροϋλλινοποιημένη ιστόνη 3 (CitH3), τα οποία λειτουργούν ως δίχτυ που μπορεί να δεσμεύσει, μεταξύ άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, gram-θετικά και -αρνητικά βακτήρια. Η ικανότητα των ουδετερόφιλων να απελευθερώνουν NETs ως μηχανισμό άμυνας στη φλεγμονή, τα οποία παραμένουν στο σημείο, προκαλώντας αλλαγές στη μορφολογία του επιθηλίου, δεν έχει μελετηθεί καθόλου στην *H. pylori* λοίμωξη. Πρότερα μη δημοσιευμένα εργαστηριακά ευρήματα του Εργαστηρίου, έχουν καταδείξει την παρουσία των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης (NETs) στον γαστρικό βλεννογόνο, σε *H. pylori*-θετικούς ασθενείς με χρόνια ενεργό γαστρίτιδα, κάνοντας χρήση βιοπτικού υλικού. Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην μελέτη του σχηματισμού και της δραστηριότητας των NETs κατά την διάρκεια της μόλυνσης με στελέχη *H. pylori*. Για αυτόν τον σκοπό απομονώθηκαν ανθρώπινα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος από υγιείς δότες και συγκαλλιεργήθηκαν σε σύστημα πειραματικής λοίμωξης με *H. pylori* ισογενή μεταλλάγματα του στελέχους αναφοράς P12 που εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό EPIYA επαναλήψεων (ABCC, ABCCC), το αντίστοιχο μεταλλαγμένο  $\Delta$ CagA, στο οποίο έχει διαγραφεί το γονίδιο *cagA* και ένα πρόσφατα απομονωμένο *H. pylori* κλινικό στέλεχος.

Η μελέτη των NETs κατά τη *H. pylori* λοίμωξη πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο απεικόνισης και οπτικοποίησης των εξωκυττάρων δικτύων Χρωματίνης (πείραμα Netosis) και τα αποτελέσματα, που παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο, ανέδειξαν την ικανότητα των ουδετερόφιλων να φαγοκυτταρώνουν το σύνολο των στελεχών του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκαν και ότι η φαγοκυττάρωση εξαρτάται από την οψωνοποίηση. Παράλληλα, μελετήθηκε η επαγωγή σχηματισμού των ROS, που ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, όπου αποδείχθηκε η ικανότητα των ουδετερόφιλων να παράγουν ROS έναντι των *H. pylori* στελεχών, αλλά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με ουδετερόφιλα που μολύνθηκαν με θετικό μάρτυρα *E. coli*. Τέλος, τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως παρόλο που τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν δίκτια NETs σαν απόκριση στην *H. pylori* λοίμωξη, τα δίκτια αυτά αποδεκατίζονται και αποσαθρώνονται, εύρημα που υποδεικνύει πιθανούς μηχανισμούς διαφυγής του *H. pylori* από την ουδετεροφιλική ανοσολογική απόκριση.

**Λέξεις κλειδιά:** *Helicobacter pylori*, CagA, ουδετερόφιλα, φλεγμονή, φαγοκυττάρωση, NETs, ROS

## Abstract

*H. pylori* is a gram-negative bacterium which colonizes the human gastric mucosa and prevalence of *H. pylori* infection is, on average, over than 50% of the total population worldwide. Persistence of *H. pylori* infection leads to the development of chronic active gastritis and duodenal ulcer formation and remains the primary risk factor for the development of gastric adenocarcinoma. The CagA protein is a major *H. pylori* virulence factor and its pathogenic activity is partly regulated by tyrosine phosphorylation on repeating EPIYA-motifs located at the C-terminal of the protein. During *H. pylori* infection, the primary cells recruited are the neutrophils, infiltrating the lamina propria thereby, becoming the hallmark of the infection and accounting for inflammation. The antimicrobial activity of neutrophils is well documented during the phagocytosis and production of Reactive Oxygen Species (ROS); hence neutrophils kill microbes inside the phagosome by releasing antimicrobial proteins, through degranulation. A third antimicrobial mechanism is the release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) which trap pathogens. NETs are composed of decondensed chromatin embedded with neutrophilic granular and cytoplasmic proteins, such as myeloperoxidase (MPO) and citrullinated histone 3 (CitH3), acting as a net for the capture of pathogens, including gram-negative and gram-positive bacteria. Considering the capacity of neutrophils to release NETs at the site of an infection and the fact that they remain in the tissue and contribute to tissue remodeling has not been adequately researched in *H. pylori* infection. Previous unpublished data of the Laboratory have demonstrated the presence of neutrophil extracellular traps (NETs) in gastric biopsies of patients diagnosed with *H. pylori* chronic active gastritis. The aim of this study was to determine the formation and activity of NETs during *H. pylori* infection. For this purpose, we isolated human peripheral blood neutrophils from healthy donors and experimentally infected those with isogenic mutants of the P12 *H. pylori* reference strain containing different numbers of EPIYA motifs (ABCC, ABCCC), or the corresponding  $\Delta$ CagA mutant and one freshly isolated clinical *H. pylori* strain. The research of NETs during the *H. pylori* infection generation was identified by protocol of generation and visualization of NETs (NETosis experiment). Results visualized by confocal microscopy revealed that neutrophils demonstrated the capacity to phagocytose all *H. pylori* strains and more specifically, that the phagocytosis is depended on opsonization. Moreover, ROS induction was detected by flow cytometry and the capacity of neutrophils to produce ROS in *H. pylori* infection has been verified, albeit being lower compared to ROS formation by neutrophils exposed to *E. coli* positive control. Our results have also demonstrated that neutrophils release NETs as an immune response against to *H. pylori*, but these NETs were found to be degraded, suggesting possible mechanisms of *H. pylori* evasion of neutrophilic immune response.

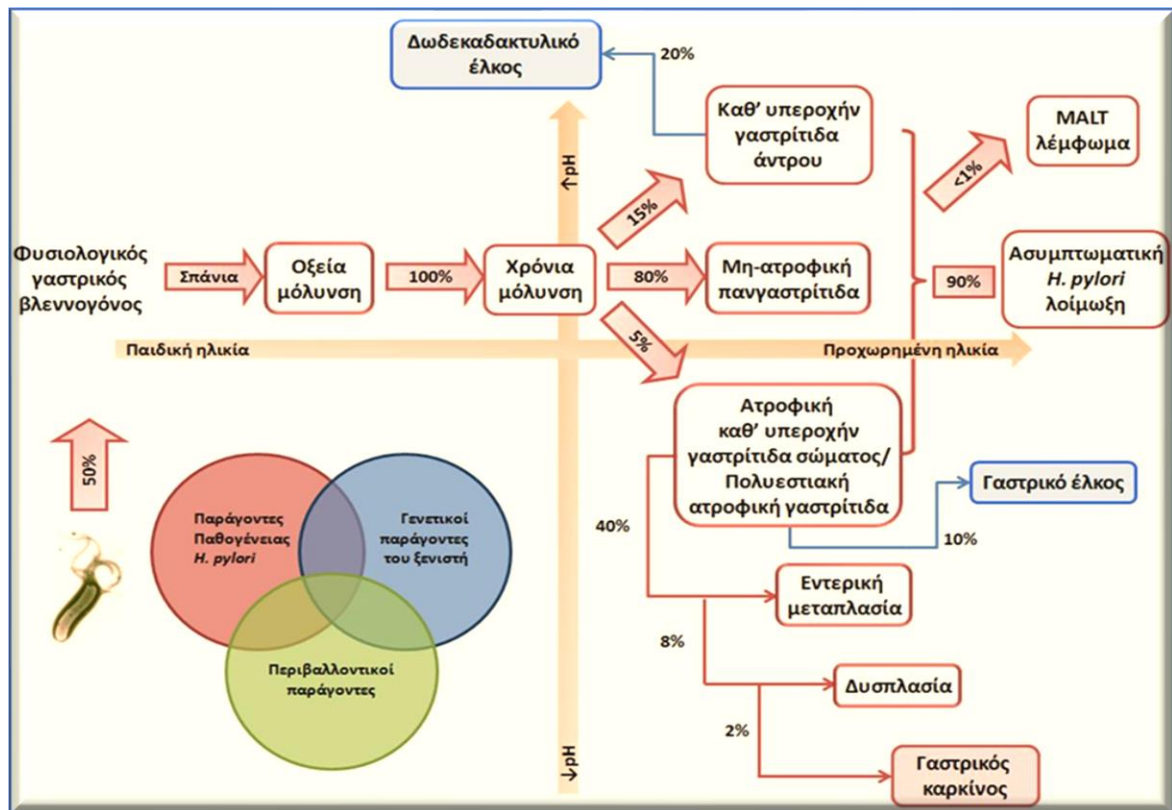
**Keywords:** *Helicobacter pylori*, CagA, neutrophils, inflammation, phagocytosis, NETs, ROS

## **A. Εισαγωγή**

## 1. Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*-*H. pylori*)

Το ελικοβακτήριο του πυλωρού είναι το συχνότερο βακτηριακό παθογόνο, που συναντάται στον άνθρωπο παγκοσμίως [1]. Πρόκειται για ένα gram-αρνητικό βακτήριο, μικροαερόφιλο, με σχήμα ραβδόμορφο, καμπυλωτό, ελικοειδές ή σχήματος S [2]. Λόγω της ικανότητας του να κινείται, αποικίζει πρώτα το άντρο του στομάχου, στην επιφάνεια του γαστρικού επιθηλίου προκαλώντας φλεγμονή και αλλαγή της αρχιτεκτονικής του γαστρικού βλεννογόνου [3]. Η λοίμωξη από *H. pylori* εμφανίζεται συνήθως κατά την παιδική ηλικία και αν δεν αντιμετωπιστεί παραμένει στην εφηβεία και καθ' επέκταση καθ' όλη την διάρκεια της ενήλικης ζωής [4]. Η παραμένουσα *H. pylori* λοίμωξη, αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα ανάπτυξης χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας και δωδεκαδακτυλικού έλκους παραμένει δε, ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη γαστρικού αδενοκαρκινώματος [3] και Β-κυτταρικού MALT λεμφώματος [4].

Στην εικόνα 1 φαίνεται η πιθανή εξέλιξη της λοίμωξης από το *H. pylori*, η οποία φαίνεται ότι μπορεί να καθορίζεται ενδεχομένως, από τους παράγοντες παθογένειας του ίδιου του βακτηρίου, από γενετικούς πολυμορφισμούς του ξενιστή που καθορίζουν την έμφυτη ανοσιακή απόκριση και περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως η διατροφή υψηλή σε αλάτι, το κάπνισμα κ.λπ. Κατόπιν εγκατάστασης της λοίμωξης παράγοντες παθογένειας του βακτηρίου και γενετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες του βακτηρίου καθορίζουν την μετάβαση σε μία κατάσταση χρόνιας γαστρικής φλεγμονής, η οποία κατά κανόνα στη συντριπτική πλειονότητα παραμένει ασυμπτωματική. Παρά ταύτα, σε ένα αριθμό των φορέων (15-20%) επάγεται αυξημένη παραγωγή οξέος, προκαλώντας καθ' υπεροχή γαστρίτιδα του άντρου, η οποία προδιαθέτει για τη δημιουργία δωδεκαδακτυλικού έλκους ή μη ατροφική παν-γαστρίτιδα. Αντίθετα, σε συνθήκες μειωμένης παραγωγής οξέος, δημιουργούνται συνθήκες εμφάνισης ατροφικής καθ' υπεροχή γαστρίτιδας σώματος, η οποία προδιαθέτει κυρίως για την εμφάνιση γαστρικού έλκους και σπανιότερα για γαστρικό καρκίνο. Ο γαστρικός καρκίνος είναι ένας από τους εξέχοντες τύπους καρκίνου παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας και παρόλο που πάνω από το 50% του παγκόσμιου πληθυσμού μεσοσταθμικά μολύνεται από το βακτήριο, μόλις το 2% αναπτύσσει γαστρικό καρκίνο σε προχωρημένη ηλικία. Επιπλέον, η *H. pylori* λοίμωξη έχει δειχθεί ότι διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη Β-κυτταρικού MALT λεμφώματος το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 3% όλων των γαστρικών όγκων [5] και επιτυχής εκρίζωση του βακτηρίου συντελεί στην πλήρη ίαση του.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της ενδεχόμενης κλινικής εξέλιξης της λοίμωξης από το *H. pylori*. Προσαρμογή από Conteduca et al. 2013 [5].

## 1.1 Ιστορική Αναδρομή του *H. pylori*

Από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα και τις αρχές του 20<sup>ου</sup> είχαν παρατηρηθεί σπειροειδείς μικροοργανισμοί σε στομάχια ζώων [6]. Λίγο αργότερα, παρατηρήθηκαν παρόμοια σπειροειδή βακτήρια και στους ανθρώπους [7], [8]. Ορισμένοι έπασχαν από πεπτικό έλκος και γαστρικό καρκίνο, ενώ κάποιοι άλλοι δεν έφεραν συγκεκριμένα κλινικά συμπτώματα, με αποτέλεσμα να υποτεθεί πως η ύπαρξη των συγκεκριμένων βακτηρίων προέρχεται από την κατανάλωση μολυσματικών τροφών [7]. Κατά την διάρκεια του Β' παγκοσμίου πολέμου, ο Έλληνας γιατρός Ιωάννης Λυκούδης, παρατήρησε ότι το δωδεκαδακτυλικό έλκος ενδέχεται να οφείλεται σε ένα μικροβιακό παράγοντα και όχι στην κακή διατροφή που έως τότε πιστευόταν, καθώς κατάφερε να θεραπεύσει περισσότερους από 30.000 ασθενείς με δωδεκαδακτυλικό έλκος με χρήση αντιβιοτικών. Η προσπάθεια του να δημοσιεύσει τις προσωπικές του καταγεγραμμένες περιπτώσεις των ασθενών του, την θεραπεία που εφάρμοσε και την λοιμώδη αιτιολογική βάση του πεπτικού και δωδεκαδακτυλικού έλκους, απέτυχε λόγω της αντίληψης περί της στείροτητας του στομάχου λόγω



της ύπαρξης χαμηλού pH, αλλά αποτέλεσε αφορμή ώστε να εκδιωχθεί από τον ελληνικό ιατρικό σύλλογο [9].

Δύο χρόνια μετά τον θάνατο του I. Λυκούδη, το 1982, στην Αυστραλία ο Barry Marshall και ο Robbin Warren εξέτασαν 100 ασθενείς και ύστερα από καλλιέργεια γαστρικών βιοψιών, ληφθέντων με γαστροσκόπηση, απομόνωσαν σπειροειδή βακτήρια στους 58 από αυτούς [2]. Η απομόνωση του βακτηρίου, οδήγησε σε οριστική ταυτοποίηση του *H. pylori* από τους Marshall και Warren. Στην συνέχεια, κατάφεραν να εξαλείψουν επιτυχώς το βακτήριο, προτείνοντας ως βακτηριακή θεραπεία την ταυτόχρονη χορήγηση, είτε αλάτων βισμούθιου και αμοξικιλίνης, είτε αλάτων βισμούθιου και τινιδαζόλης και πρότειναν την λοιμώδη αιτιολογία ως βάση για το πεπτικό έλκος [10], [11]. Αρχικά, το βακτήριο που απομονώθηκε ονομάστηκε *Campylobacter pylori*, αλλά αργότερα και έως σήμερα, μετονομάστηκε σε *Helicobacter pylori*, διότι διαφέρει από τα είδη του γένους *Campylobacter* [12]. Αξίζει να σημειωθεί πως οι δύο ερευνητές Marshall και Warren τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Ιατρικής ή Φυσιολογίας, το 2005 για την ανακάλυψη του *H. pylori* [13] και το ρόλο του στην ανάπτυξη γαστρίτιδας και πεπτικής νόσου, καθώς αυτό αποτέλεσε σταθμό στη Γαστρεντερολογία σε παγκόσμιο επίπεδο.

## 1.2 Ταξινόμηση και Φυλογενετική Οργάνωση

Σύμφωνα με την κατάταξη των φυσικών συστημάτων που πρότειναν οι Woese *et al.* το 1990 [14], το *H. pylori* ανήκει στο βασίλειο των βακτηρίων, την επικράτεια των ευβακτηρίων, το φύλο των πρωτεοβακτηρίων και την κλάση των ε-πρωτεοβακτηρίων. Σύμφωνα με την ταυτοποίηση και κατηγοριοποίηση των ειδών του ελικοβακτηρίου, δημιουργήθηκε το γένος *Helicobacter* το 1989 για κάποια είδη που επαναταξινομήθηκαν από το γένος *Campylobacter* [15] καθώς διέθεταν εμφανή διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά. Το 1991 τα γένη *Helicobacter*, *Campylobacter* και *Arcobacter*, ταξινομήθηκαν φυλογενετικά στην νέα οικογένεια *Campylobacteraceae*, σύμφωνα πάντα με την γονιδιακή τους ανάλυση γονιαδιακών υπομονάδων rRNA του γονιδίου 16S rRNA [16], διαμορφώνοντας τελικά το φυλογενετικό δέντρο του είδους *H. pylori*, όπως συνοψίζεται στον πίνακα 1.

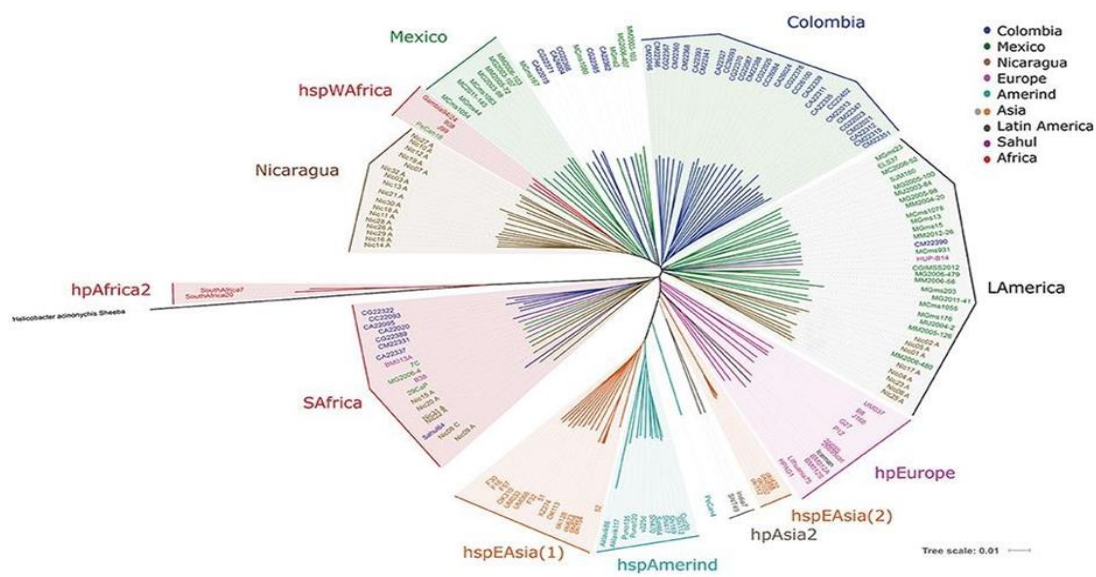
Βασίλειο	Βακτήρια
<b>Επικράτεια</b>	Ευβακτήρια
<b>Φύλο</b>	Πρωτεοβακτήρια
<b>Κλάση</b>	Ε-πρωτεοβακτήρια
<b>Τάξη</b>	Campylobacterales
<b>Οικογένεια</b>	Helicobacteraceae
<b>Γένος</b>	Helicobacter
<b>Είδος</b>	<i>H. pylori</i>

Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση του *H. pylori*. Προσαρμογή: Woese et al., 1990 [14] και Owen J., 1998 [15].

Η οικογένεια Helicobacteraceae περιλαμβάνει και άλλα γένη [17]. Το γένος Helicobacter περιλαμβάνει ελικοειδή ή ραβδόμορφα κατά gram αρνητικά, μικροαερόφιλα βακτηρία. Από όλα τα είδη του γένους, το *H. pylori* είναι το πιο γνωστό ως παθογόνο του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα και το πιο σημαντικό από άποψη επιπτώσεων στην δημόσια υγεία. Τα είδη του γένους Helicobacter, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τα *γαστρικά* και τα μη γαστρικά ή *εντεροηπατικά*, εξ' αιτίας της υψηλής εξειδίκευσής τους να αποικίζουν αντίστοιχα είτε το στομάχο, είτε το έντερο και τα ηπατοχολικά όργανα. Παρόλο που τα γαστρικά είδη έχουν μελετηθεί περισσότερο, κυρίως λόγω της συσχέτισης τους με το γαστρικό καρκίνο, αποτελούν μόνο το ένα τρίτο του γένους [16]. Τα είδη του γένους Helicobacter είναι πολλά. Από αυτά τουλάχιστον είκοσι τέσσερα είναι αναγνωρισμένα και τουλάχιστον άλλα τριανταπέντε αναμένεται να αναγνωριστούν. Κάποια από αυτά τα είδη είτε τα γαστρικά είτε τα εντεροηπατικά έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο και κάποια από διάφορα είδη ζώων, ενώ ορισμένα από αυτά μπορούν να ανευρεθούν τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, δημιουργώντας πιθανότητα ζωνόσων [17].

Για την φυλογενετική ανάλυση του *H. pylori* αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της *πολυτοπικής ανάλυσης αλληλουχίας* (Multi Locus Sequence Tagging- MLST) που συγκρίνει την νουκλεοτιδική αλληλουχία συγκεκριμένων γονιδίων των διαφόρων στελεχών του ελικοβακτηρίου

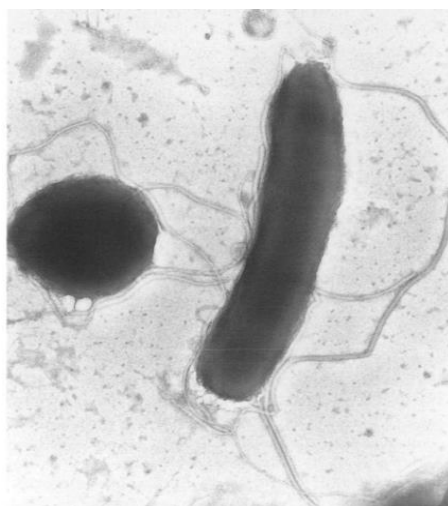
και το πρόγραμμα Structure που αναλύει πληθυσμούς. Στη συγκεκριμένη ανάλυση δημιουργείται ένα υβριδικό τμήμα γενετικής αλληλουχίας από συγκεκριμένες περιοχές 7 συντηρημένων γονιδίων του *H. pylori* (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* και *yphC*) και 2 γονιδίων που σχετίζονται με την λοίμωξη και είναι τα *vacA* και *cagA*, δίνοντας ένα συνολικό μήκος 3.406 bp. Οι αναλύσεις των στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες, αποδεικνύουν πως υπάρχει ανασυνδυασμός στα χρωμοσώματα του *H. pylori* και πως το κάθε σύγχρονο στέλεχος δεν αποτελείται από γενετικό υλικό που προέρχεται μόνο από ένα προγονικό στέλεχος αλλά από μίγμα προγονικών πληθυσμών. Επίσης, με τις αναλύσεις προκύπτει, αφ' ενός το φυλογενετικό δέντρο των στελεχών του *H. pylori*, αφ' ετέρου δε, μπορεί να προσδιοριστεί η ηλικία εμφάνισης του συγκεκριμένου στελέχους. Τέτοιες μελέτες βοηθούν στην ταυτοποίηση των στελεχών που επικρατούν σε κάθε μήκος και πλάτος της γης ανά χώρα και ήπειρο [18]. Τέλος, μέσω των φυλογενετικών αναλύσεων απεδείχθη ότι το *H. pylori* συνόδευσε τον μοντέρνο άνθρωπό κατά την έξοδο του από την Αφρική και κατόπιν μέσω των μετακινήσεων των πληθυσμών ανά τους αιώνες σε όλη την γη, καθώς επεκτάθηκε προς την Ανατολική Ασία, την Βόρεια Αμερική και Νότια Αμερική και τα νησιά του Ειρηνικού Ωκεανού (Εικόνα 2). Η ανθρώπινη λοίμωξη από *H. pylori* υφίσταται για τουλάχιστον 88.000-116.000 χρόνια και αποτελεί προϊόν συνεξέλιξης του ανθρώπου και των βακτηρίων [19].



Εικόνα 2. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών *H. pylori*. Προσαρμογή από: Kusters et al., 1997 [20].

### 1.3 Μορφολογία και Φυσιολογία του *H. pylori*

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το *H. pylori* είναι ένα μικροαερόφιλο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο, σε σχήμα ελικοειδούς βακίλου [2]. Ωστόσο, μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια σε στερεό ή υγρό μέσο, το ελικοβακτήριο του πυλωρού έχει την ικανότητα να αλλάζει την μορφή του σε κοκκοειδή μορφή, η οποία είναι ορατή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παραμένει μεταβολικά ενεργή, αλλά δεν μπορεί να καλλιεργηθεί *in vitro* (Εικόνα 3). Οι κοκκοειδείς μορφές έχουν βρεθεί σε πολλά δείγματα και θεωρούνται πως συμβάλουν στην μετάδοση της λοίμωξης [20]. Το *H. pylori* έχει μήκος 2-4 μm και πλάτος 0,5-1 μm. Διαθέτει 2-6 μαστίγια συνήθως μονοπολικά, μήκους περίπου 3 μm, τα οποία ξεκινούν από το ίδιο σημείο και φέρουν χαρακτηριστικά στρογγυλεμένα άκρα σχήματος βολβού. Τα μαστίγια και η σπειροειδής μορφολογία του προσδίδουν μεγάλη κινητικότητα, κυρίως σε διαλύματα αυξημένου ιζώδους, όπως είναι η βλέννα που καλύπτει τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [21]. Σε αντίθεση με πολλά άλλα παθογόνα του γαστρεντερικού σωλήνα, στερείται ινιδίων προσκόλλησης [13]. Ο κυτταρικός φάκελος έχει παρόμοια δομή με άλλων gram αρνητικών βακτηρίων. Αποτελείται από μια εσωτερική και μία εξωτερική μεμβράνη. Η εσωτερική μεμβράνη αποτελείται από περίπλασμα με πεπτιδογλυκάνη ενώ η εξωτερική από φωσφολιπίδια, λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και μόρια χοληστερόλης, από τα οποία, τα τελευταία συναντώνται σπάνια σε βακτήρια. Ο LPS του *H. pylori* έχει χαμηλή βιολογική δραστηριότητα συγκρινόμενος με αυτόν άλλων βακτηρίων. Τα κλινικά στελέχη που έχουν απομονωθεί από ασθενείς διαθέτουν LPS μεγάλου μοριακού βάρους με ένα αντιγόνο O αλλά καλλιεργούμενα μπορούν να παραλλαχθούν σε μορφές LPS που στερούνται πλευρικής αλυσίδας O. Η ειδική αλυσίδα O του *H. pylori* μιμείται αντιγόνα τύπου *Lewis* και άλλων ομάδων αίματος του ξενιστή, κάτι που του προσδίδει ικανότητα ανοσοδιαφυγής. Επίσης μεταβάλλει την φάση του μέσω παραλλαγών των δεσμών σε γονίδια που κωδικοποιεί, γεγονός που συμβάλλει στην ετερογένεια του και στην προσαρμογή του βακτηρίου στις μεταβαλλόμενες συνθήκες [22].



Εικόνα 3. Εμφάνιση τυπικών κοκκοειδών και βακιλλικών μορφών *H. pylori*. Προσαρμογή από: Owen *et al.*, 1998 [15].

Το *H. pylori* είναι μικροαερόφιλο δηλαδή δεν ανέχεται υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Αυτό συμβαίνει επειδή το βακτήριο χρησιμοποιεί το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, διότι δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει εναλλακτικούς δέκτες. Για την βέλτιστη ανάπτυξη του απαιτούνται επίπεδα οξυγόνου 2-5%, υψηλή υγρασία ενώ δεν χρειάζεται υδρογόνο. Οι πρότυπες εργαστηριακές συνθήκες που ακολουθούνται για την καλλιέργεια του είναι 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> και 5% O<sub>2</sub>, ενώ η βέλτιστη ανάπτυξη του εμφανίζεται σε θερμοκρασία 37°C και ουδέτερο pH [23] όπου σχηματίζει μικρές, διάφανες, λείες αποικίες [24]. Μπορεί να επιβιώσει σε pH 4 για μικρό χρονικό διάστημα, αλλά εργαστηριακά θα αναπτυχθεί μόνο σε ένα εύρος pH από 5,5 έως 8,0, αναπτυσσόμενο καλύτερα σε ουδέτερο pH [23]. Παραδόξως, αν και εργαστηριακά το ελικοβακτήριο του πλωρού αναπτύσσεται βέλτιστα σε ουδέτερο pH, στο φυσικό ξενιστή καταφέρνει να αποικίζει και να παραμένει στον ανθρώπινο στόμαχο, περιβάλλον που θεωρείται αφιλόξενο λόγω του χαμηλού pH. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το *H. pylori* συνθέτει μεγάλες ποσότητες ουρεάσης, ενός ενζύμου μέσω του οποίου διασπά την ουρία σε CO<sub>2</sub> και αμμωνία, αλκαλοποιώντας το όξινο pH του άμεσου περιβάλλοντος του. Δεδομένου ότι τα αμινοξέα και η ουρία είναι οι κύριες πηγές αζώτου στο γαστρικό περιβάλλον και η αμμωνία βασικό συστατικό στο μεταβολισμό του αζώτου, το *H. pylori* χρησιμοποιεί διαφορετικές πηγές αμμωνίας καταφέροντας να εγκαθίσταται στο στομάχι. Η ουρεάση θεωρείται ότι είναι ένας από τους κύριους παράγοντες παθογένειας του *H. pylori* καθώς δρα στα αρχικά στάδια της πρωτολοίμωξης και απουσία αυτής δεν είναι ικανή η εγκατάσταση επιτυχούς λοίμωξης. Η ουρεάση, όπως και άλλα ένζυμα του βακτηρίου όπως η καταλάση και η οξειδάση, παράγεται μέσω της δράσης της υδροξυγονάσης η οποία οξειδώνει το μοριακό H<sub>2</sub> που παράγεται στο στομάχι και έτσι χρησιμοποιείται από το *H. pylori* ώστε να επιτελέσει τις λειτουργίες του [25].

Για την εργαστηριακή καλλιέργεια του *H. pylori* απαιτεί πολύπλοκα στερεά ή υγρά μέσα εμπλουτισμένα με συμπληρώματα, που χρησιμεύουν και ως θρεπτικά υποστρώματα, προστατεύοντας τον παθογόνο μικροοργανισμό, όπως για παράδειγμα αίμα, αίμη, ορό, άμυλο καλαμποκιού ή γαλάκτωμα κρόκου αυγού. Άριστη ανάπτυξη του *H. pylori* επιτυγχάνεται και με την χρήση κυκλοδεξτρινών [21]. Στερεά θρεπτικά μέσα περιέχουν Columbia άγαρ με αιμολυμένο αίμα αλόγου και ορό βόειων εμβρύων με την προαιρετική χρήση δύο κατηγοριών μιγμάτων αντιβιοτικών, εμπορικά διαθέσιμων. Είτε ένα μίγμα συμπληρώματος Dent εμπλουτισμένο με βανκομυκίνη, τριμεθοπρίμη, κεφσουλοδίνη, αμφοτερικίνη Β [26] είτε το μίγμα συμπληρώματος Skirrow που είναι εμπλουτισμένο με βανκομυκίνη, τριμεθοπρίμη, πολυμυξίνη Β και αμφοτερικίνη Β [27]. Τα υγρά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν ζωμό Mueller-Hinton ή BHIB ή Columbia, εμπλουτισμένο με 2-10% ορό βοδιού ή 0,2-1% β-κυκλοδεξτρίνες, συνήθως εμπλουτισμένα με τα συμπληρώματα Dent ή Skirrow [28]. Η καλλιέργεια του ελικοβακτηρίου του πυλωρού αναπτύσσεται σε 3-14 ημέρες αλλά η βέλτιστη βιωσιμότητα εμφανίζεται στις 48 ώρες επώασης των τρυβλίων, όπου και παραμένει σε σπειροειδή μορφή. Μετά την απομόνωση του βακτηρίου από γαστρικές βιοψίες, διαδικασία δύσκολη και όχι πάντα επιτυχή [24], δεν είναι υποχρεωτικό το βακτήριο να καλλιεργηθεί αμέσως αλλά μπορεί να κρυοσυντηρηθεί στους -80°C σε BHIB ή ζωμό βρουκέλλας που περιέχουν 15-20% γλυκερόλη ή 10% DMSO [13].

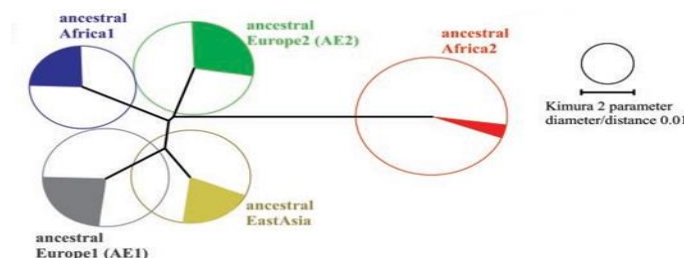
#### **1.4 Επίπτωση στην Δημόσια Υγεία και ανθρώπινες μεταναστεύσεις**

Το ποσοστό της λοίμωξης από *H. pylori* ανέρχεται μεσοσταθμικά περίπου στο 50% του παγκόσμιου πληθυσμού και αποτελεί το πιο κοινό παθογόνο του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου παγκοσμίως [4]. Συνοδεύει τον άνθρωπό από την έξοδο του από την Αφρική και έχει χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ) το 1994, ως καρκινογόνο πρώτης τάξεως [29]. Το *H. pylori* είναι το μόνο βακτήριο που μέχρι σήμερα έχει σαφώς συνδεθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου [30]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το *H. pylori* είναι ένα βακτήριο το οποίο αποικίζει τον πυλωρό του ανθρώπινου στομάχου κατά την παιδική ηλικία και αν δεν θεραπευτεί παραμένει για δεκαετίες ή ακόμα και για όλη την διάρκεια ζωής. Υπολογίζεται πως οι άνθρωποι φέρουν  $10^4$ - $10^7$  CFU ανά γραμμάριο γαστρικής βλέννας [31].

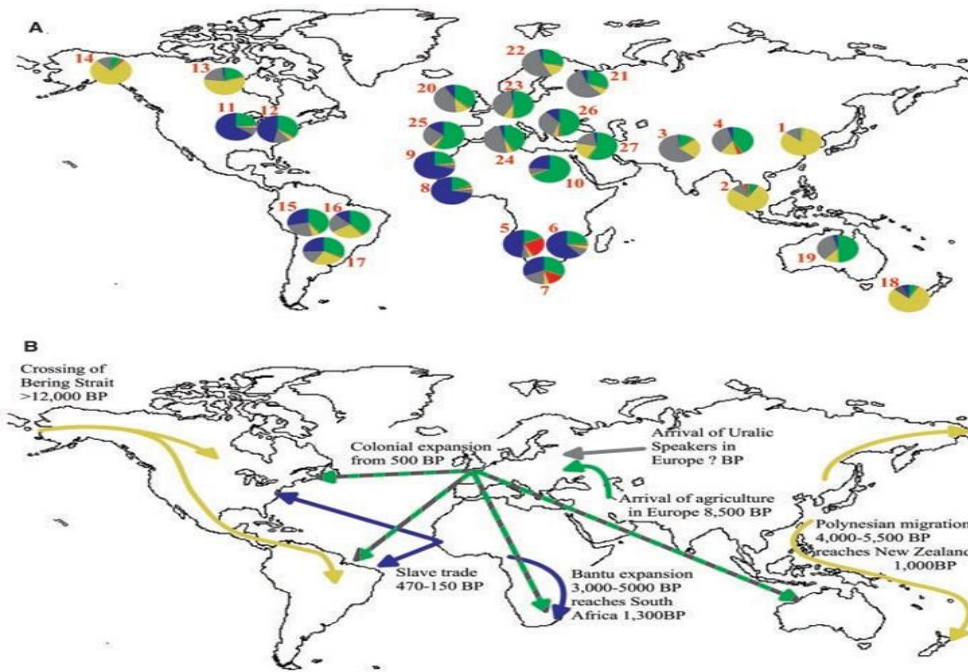
Επειδή δεν είναι δυνατόν να εξακριβωθεί πότε εμφανίζεται η λοίμωξη από *H. pylori*, γίνονται μελέτες επιπολασμού από ορούς [32]. Ο επιπολασμός εμφανίζει μεγάλη γεωγραφική διακύμανση και ποικίλει ανάλογα με την κοινωνική και οικονομική κατάσταση, τις συνθήκες διαβίωσης κυρίως των παιδιών [33] την ηλικία και τη φυλή [32], καθώς άνθρωποι Δυτικών ανεπτυγμένων χωρών με

υψηλότερη κοινωνικό-οικονομική θέση τείνουν να έχουν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά μόλυνσης. Συμπερασματικά, ο επιπολασμός του *H. pylori* είναι υψηλότερος στους μετανάστες σε χώρες της Δύσης από ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες, στις οποίες παραμένει σχετικά σταθερός, ενώ στις βιομηχανικές χώρες μειώνεται με γρήγορο ρυθμό. Συγκεκριμένα, στις Δυτικού τύπου βιομηχανικές χώρες η λοίμωξη από *H. pylori* παραμένει σε ποσοστό μικρότερο του 40% με μεγαλύτερη εμφάνιση στους ενήλικες από ότι στα παιδιά. Στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες εμφανίζεται σε μέσο ποσοστό 80% ακόμα και στις πιο νεαρές ηλικίες. Στις ανεπτυγμένες το ποσοστό λοίμωξης μεσοσταθμικά ανέρχεται σε ποσοστό 25-50% [32]. Ακόμα, από μελέτες φαίνεται το φύλο να μην επηρεάζει στην λοίμωξη από *H. pylori* [34].

Για την ανάλυση παγκόσμιων δειγμάτων *H. pylori* ορίστηκαν 5 προγονικοί πληθυσμοί Africa1, Africa2, EastAsia, Ευρώπη1 (AE1) και Ευρώπη2 (AE2) όπως φαίνεται στην εικόνα 4 [35]. Η κατανομή των πληθυσμών του *H. pylori* συνάδει με τις ανθρώπινες μεταναστεύσεις, αντιστοιχίζοντας το κάθε στέλεχος του με τις σύγχρονες ανθρώπινες φυλές (Εικόνα 5). Τα σύγχρονα στελέχη του *H. pylori* υποδιαιρούνται σε έξι κύριους πληθυσμούς, hpAfrica1 (που αποτελείται από τους υποπληθυσμούς hspWAfrica και hspSAfrica), hpAfrica2 και hpNEAfrica, hpEurope, hpAsia2 και τον hpEastAsia (που αποτελείται από τους υποπληθυσμούς hspEAsia, hspMaori και hspAmerind). Σχεδόν όλα τα στελέχη του *H. pylori* που απομονώθηκαν από χώρες της Ανατολικής Ασίας εντάχθηκαν στον υποπληθυσμό hspEAsia. Στελέχη από τους Μαόρι (ιθαγενείς της Νέας Ζηλανδίας) και άλλους Πολυνήσιους της Νέας Ζηλανδίας εντάχθηκαν στον υποπληθυσμό hspMaori. Ενώ στον υποπληθυσμό hspAmerind εντάχθηκαν στελέχη που απομονώθηκαν από τους ιθαγενείς Ίνουιτ και από άλλες περιοχές της Βόρειας και Νότιας Αμερικής. Οι πληθυσμοί hspSAfrica and hpAfrica2 απαντώνται μόνο Νότια Αφρική. Στελέχη του hspWAfrica ταυτοποιήθηκαν στην Νότια και Δυτική Αφρική αλλά και στους Αφρικανικής προέλευσης πληθυσμούς της Αμερικής. Ο hpEurope περιέχει πολυποίκιλα γενετικά στοιχεία και πηγάζει εν μέρει από τα hpEastAsia και hpAfrica1.



Εικόνα 4. Συσχέτιση στελεχών *H. pylori*. Προσαρμογή: Falush et al., 2003 [35].



Εικόνα 5. Γεωγραφική κατανομή των στελεχών *H. pylori* παγκοσμίως βάσει μεταναστεύσεων των ανθρωπίνων πληθυσμών. Προσαρμογή: Falush et al., 2003: [35].

## 1.5 Μετάδοση

Ο ακριβής μηχανισμός μετάδοσης του *H. pylori* παραμένει άγνωστος. Υπάρχουν ενδείξεις για πιθανές οδούς μετάδοσης του ελικοβακτηρίου του πυλωρού. Η μετάδοση θεωρείται πως γίνεται από άτομο σε άτομο μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μέσω μολυσμένων τροφίμων και νερού. Η πιο κοινή οδός μόλυνσης ενδεχομένως, συμβαίνει μέσω στοματοστοματικής οδού από το σάλιο, την οδοντική πλάκα και την κατανάλωση μολυσμένου φαγητού που παρασκευάζεται από μολυσμένο από *H. pylori* άτομο. Η μετάδοση μπορεί επίσης να γίνει γαστρο-στοματικά με γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση είτε με έκθεση σε έμετο από μολυσμένο άτομο [36]. Έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά μετάδοσης μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας, καθώς απομονώνεται το ίδιο στέλεχος με ίδιο γονότυπο μεταξύ ζευγαριών αλλά και γονιών-παιδιών και μεταξύ αδερφών σε μικρή ηλικία. Πιο πιθανή μετάδοση θεωρείται πως συμβαίνει από την μητέρα στα παιδιά από μικρή ηλικία κυρίως μέσω της τροφής [32], [37], [38]. Το *H. pylori* θεωρείται τροφιμογενές παθογόνο, διότι έχει ανιχνευτεί μετά από κατανάλωση μολυσμένου ή θαλασσινού νερού, βρώσιμων τροφών όπως λαχανικά, τρόφιμα και σαλάτες έτοιμες για κατανάλωση, σε παστεριωμένους χυμούς φρούτων αλλά και σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης νωπών και επεξεργασμένων που έχουν υποστεί ζύμωση, πιο σπάνια στο γάλα και έπειτα από κατανάλωση αλκοόλ. Το μολυσμένο με περιττώματα νερό είναι πολύ πιθανή αιτία μόλυνσης, ιδιαίτερα σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου δεν υπάρχει ή υπάρχει σύστημα ύδρευσης



κακής ποιότητας, με αποτέλεσμα το πόσιμο νερό να μην είναι καθαρό και να χρησιμοποιείται και για τις καλλιέργειες. Επίσης, σε αυτές τις περιπτώσεις, πέρα από το νερό, σημαντικό ρόλο παίζει και στο έδαφος ο τύπος κοπριάς που χρησιμοποιείται καθώς πολλές φορές είναι κομπόστα από κοπριά αγροτικών ζώων η οποία περιέχει βακτήρια τα οποία δημιουργούν βιοφιλμ και διευκολύνεται έτσι η διαπερατότητα τους στα ύδατα, τα οποία καταναλώνονται από τους ανθρώπους [39]. Τέλος, αν και παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης *H. pylori* λοίμωξης με μετάδοση από οικόσιτα ζώα, όπως για παράδειγμα γάτες ή πρόβατα στον άνθρωπο, θεωρείται εξαιρετικά σπάνια αυτή η μορφή μετάδοσης [32]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει υψηλότερο επιπολασμό αντισωμάτων κατά του *H. pylori* σε εργαζόμενους σε σφαγεία, γεγονός που υποδηλώνει πως τα ζώα μπορεί να αποτελούν πηγή μόλυνσης [40].

Άλλοι παράγοντες που φαίνονται να συμβάλλουν στην λοίμωξη από ελικοβακτήριο του πυλωρού είναι το κάπνισμα, το αλκοόλ, η διατροφή, η επαγγελματική έκθεση, οι κοινωνικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι συνθήκες υγιεινής, το οικογενειακό ιστορικό γαστρικής νόσου [32] και η απουσία πλυσίματος χεριών ειδικά μετά από τουαλέτα ή έμετο [39]. Οι πιθανές οδοί μετάδοσης του *H. pylori* είναι σημαντικές για την δημόσια υγεία ώστε να εφαρμοστούν μέτρα πρόληψης και να παρεμποδιστεί η εξάπλωση του. Ωστόσο για όλες τις οδούς υπάρχουν ενδείξεις ως πιθανές πηγές μόλυνσης και μετάδοσης. Ο μόνος αποδεδειγμένος [32] αλλά λιγότερο συχνός [21] τρόπος μετάδοσης είναι η ιατρογενώς κατά την ενδοσκοπήση ασθενών από την μη χρήση γαντιών και από την χρήση μη αποστειρωμένων και μολυσμένων εργαλείων [32].

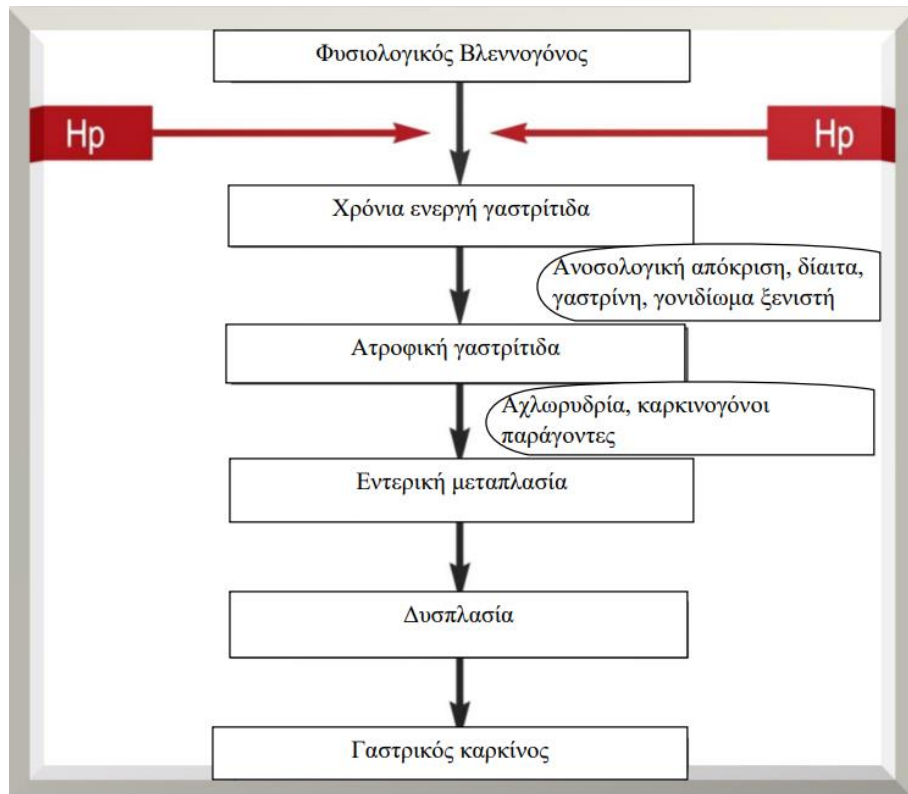
## 1.6 Γενετική ποικιλομορφία

Ένα χαρακτηριστικό που διακρίνει το γονιδίωμα του *H. pylori* από άλλα ανθρώπινα παθογόνα βακτήρια, είναι η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών που έχουν απομονωθεί, λόγω του υψηλού ρυθμού ανασυνδυασμού και των σημειακών μεταλλάξεων [29]. Προκειμένου να ερευνηθεί το γονιδίωμα του *H. pylori* αλληλουχίστηκαν πλήρως τα στελέχη J99 και 26695 και συγκρίθηκαν μεταξύ τους [41]. Το *H. pylori*, έχει ένα μικρό γονιδίωμα 1,67 Mb, με αναλογία G+C 37 % [4] αρκετά χαμηλότερη από αυτήν που αναφέρεται για τα χρωμοσωμικά γονίδια του *H. pylori* (40%) [41] και περιέχει λίγα μεταβολικά γονίδια [4]. Τα περισσότερα στελέχη περιέχουν πλασμίδια στα οποία δεν έχουν αναγνωριστεί λοιμογόνοι παράγοντες. Το γονιδίωμα του διαθέτει δύο αντίγραφα από τα δύο γονίδια 16S και 23S 5SrRNA [41]. Λόγω της υψηλής γενετικής ποικιλομορφίας του ελικοβακτηρίου του πυλωρού και της ποικιλίας αλληλομόρφων, ο κάθε ξενιστής φέρει ένα ξεχωριστό στέλεχος του *H. pylori* με μοναδικό γενετικό μοτίβο [24]. Ακόμα και σε έναν φαινομενικά ομοιογενή πληθυσμό,

υπάρχουν γενετικές διαφορές μεταξύ των στελεχών *H. pylori* σε μία μόνο αποικία [41]. Συμπερασματικά υπάρχουν πολλά στελέχη του *H. pylori* και κάθε άτομο μπορεί να προσβληθεί ταυτόχρονα από πολλά στελέχη [42]. Το γονιδίωμα του *H. pylori* κωδικοποιεί 1500 πρωτεΐνες. Μέσω της αλληλούχισης του γονιδιώματος, ανακαλύφθηκε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης, οι Hop, που περιλαμβάνουν τις πιο γνωστές προσκολλητίνες και είναι περίπου 32, καθώς και γονίδια τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν και να απενεργοποιηθούν από λάθος ταίριασμα μέσω μεταλλαγών. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τέτοια γονίδια μεταβλητής φάσης, περιλαμβάνουν ένζυμα που τροποποιούν την αντιγονική δομή των επιφανειακών μορίων, ελέγχουν την είσοδο ξένου DNA στα βακτήρια και επηρεάζουν την βακτηριακή κινητικότητα. Το γονιδίωμα του *H. pylori* αλλάζει συνεχώς κατά την χρόνια αποίκιση ενός μεμονωμένου ξενιστή, εισάγοντας μικρά κομμάτια DNA από άλλα στελέχη του *H. pylori* κατά την διάρκεια λοιμώξεων [43].

### **1.7 Συμπτώματα και κλινική εικόνα της λοίμωξης από *H. pylori***

Ο αποικισμός του *H. pylori* δεν αποτελεί ασθένεια ούτε από μόνη της ούτε από την αρχή. Είναι χρόνια και συνήθως ασυμπτωματική, επομένως οι φέροντες ελικοβακτήριο του πυλωρού δεν παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστική κλινική εικόνα, εκτός από ένα μικρό ποσοστό. Η χρόνια παραμονή του όμως αυξάνει τον κίνδυνο ορισμένων νόσων του γαστρεντερικού συστήματος και πιθανώς της ηπατοσπληνικής οδού (Εικόνα 6). Η ανίχνευση του συμβάλει στον εντοπισμό της αιτίας μίας υποκείμενης νόσου και φυσικά στην πρόληψη σοβαρότερων παθολογικών καταστάσεων, αφού το 10-20% των θετικών *H. pylori* θα εμφανίσουν έλκος και το 1-2% γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [13]. Το *H. pylori* αποικίζει ολόκληρο το γαστρικό επιθήλιο από το προπυλωρικό άντρο μέχρι την καρδιά [44]. Έχουν γίνει έρευνες σε πειραματόζωα για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του *H. pylori* με την φυσιολογική μικροχλωρίδα του στόμαχου και του εντέρου, αλλά και των πιθανών αλλαγών κατά την μόλυνση ή μετά την εκρίζωση του *H. pylori*. Πράγματι υφίσταται αλληλεπίδραση μεταξύ τους και έτσι το φυσιολογικό μικροβίωμα του στομάχου και του εντέρου μπορεί να μεταβάλλεται συντελώντας έτσι σε αλλαγές στη φλεγμονώδη απόκριση τουλάχιστον σε πειραματικά ζωικά μοντέλα σε σχέση με τα αμόλυντα. Επίσης αυτή η συσχέτιση συναρτάται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις του εντέρου και εμφάνιση νόσων πιο πολύπλοκων όταν προκαλούνται από *H. pylori* [45]. Άλλες πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν πως η επικράτηση του *H. pylori* έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια, με ταυτόχρονη αύξηση της γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης και του αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου, υποδεικνύοντας πως το *H. pylori* ίσως παίζει και ένα προστατευτικό ρόλο, ως μέλος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του οργανισμού [46].



Εικόνα 6. Σχεδιάγραμμα της κλινικής πορείας και ιστολογικών αλλοιώσεων στην διάρκεια της χρόνιας *H. pylori* λοίμωξης, όπως τεκμηριώθηκε από τον Correa et al., Προσαρμογή από Kusters et al., 2006 [13].

### 1.7.1 Οξεία Γαστρίτιδα

Η αρχική φάση της λοίμωξης είναι η οξεία γαστρίτιδα, η οποία όμως δεν έχει εξεταστεί ιδιαίτερα, παρά μόνο σε υγιείς δότες που προθυμοποιήθηκαν να μολυνθούν με εργαστηριακά στελέχη του *H. pylori*. Η φάση αυτή περιλαμβάνει εφήμερα συμπτώματα δυσπεψίας, αίσθημα πληρότητας, ναυτία και έμετο, φλεγμονή του βλεννογόνου του στομάχου και πανγαστρίτιδα. Φαίνεται να συντελεί στην μείωση του υδροχλωρικού οξέος ακόμα και μήνες μετά την είσοδο του βακτηρίου στο στόμαχο. Οι έρευνες κατέδειξαν πως κάποια άτομα είναι σε θέση να αποτρέψουν τον επιτυχή αποικισμό του ελικοβακτηρίου του πυλωρού ενώ κάποια άλλα όχι και πως ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες το επίπεδο έκθεσης στο *H. pylori* είναι ιδιαίτερα υψηλό, κάποια άτομα δεν αναπτύσσουν ποτέ εμμένουσα λοίμωξη [13].

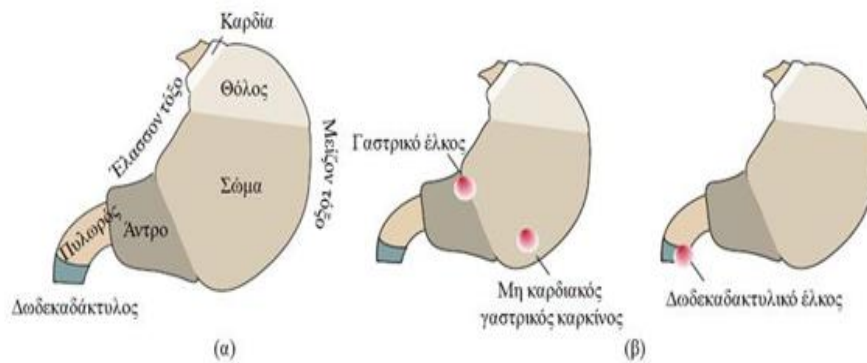
### 1.7.2 Χρόνια Γαστρίτιδα

Η παραμονή της λοίμωξης από *H. pylori* που υφίσταται στην παιδική ηλικία, οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή σε περισσότερο από το ήμισυ του παγκόσμιου πληθυσμού. Η χρόνια γαστρίτιδα εμφανίζεται είτε με ατροφική είτε ως μη ατροφική μορφή και σχετίζεται με τα επίπεδα έκκρισης γαστρικού οξέος και την κατανομή της γαστρίτιδας (Εικόνα 7) [47]. Συγκεκριμένα, το γαστρικό οξύ επιδρά στην βακτηριακή ανάπτυξη και κατ' επέκταση στην φλεγμονή του βλεννογόνου και η ανάπτυξη του *H. pylori* επηρεάζει τα επίπεδα έκκρισης του οξέος. Αυτή η αλληλεπίδραση ουσιαστικά καθορίζει την ποσότητα του γαστρικού οξέος που εκκρίνεται και την πορεία της χρόνιας λοίμωξης από το ελικοβακτήριο του πυλωρού. Σε ασθενείς με φυσιολογική έκκριση οξέος η γαστρίτιδα εμφανίζεται στο άντρο προκαλώντας χαμηλή γαστρίτιδα του άντρου. Σε ασθενείς με μειωμένη έκκριση εμφανίζεται ομοιόμορφη κατανομή του *H. pylori* στο άντρο και στο σώμα του στομάχου προκαλώντας πανγαστρίτιδα του σώματος και ατροφική γαστρίτιδα. Σε αυτήν την περίπτωση υπάρχουν λίγα τοιχωματικά κύτταρα αλλά και μικρός αριθμός εποικιζόμενων βακτηρίων. Η μειωμένη έκκριση οξέος μπορεί να οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό των εκκριτικών κυττάρων ή στην καταστολή της λειτουργίας τους από τους PPI. Η ατροφική γαστρίτιδα χαρακτηρίζεται από απώλεια φυσιολογικών βλεννογόνων στο άντρο και στο σώμα και τελικά είναι αυτή που μπορεί να οδηγήσει σε εντερική μεταπλασία [47]. Σε απουσία των τοιχωματικών εκκριτικών κυττάρων δημιουργείται υποχλωρυδρία (ή και αχλωρυδρία) με συνοδό σημαντική αύξηση του pH του στομάχου και εμφάνιση εντερικής μεταπλασίας. Αυτό το γεγονός οδηγεί το *H. pylori* να μεταναστεύσει προς άλλα μέρη του ανθρώπινου στομάχου, η ανατομική δομή του οποίου φαίνεται στην εικόνα 8. Αντίθετα, σε συνθήκες υψηλής έκκρισης οξέος, το *H. pylori* αποικίζει το άντρο δημιουργώντας την κυρίαρχη γαστρίτιδα του άντρου [48].

Η χρόνια φλεγμονή αποτελεί την κύρια κλινική εικόνα της λοίμωξης, αφού συνοδεύεται από διήθηση του βλεννογόνου από ουδετερόφιλα και μονοπύρηννα κύτταρα, που καθορίζουν αντίστοιχα την δραστηριότητα και βαρύτητα της επαγόμενης φλεγμονής. Μάλιστα η εμφάνιση των ουδετερόφιλων κυττάρων αποτελεί σήμα κατατεθέν της λοίμωξης από *H. pylori*.

Τύπος Γαστρίτιδας	Ιστολογία γαστρικού επιθηλίου	Ιστολογία Δωδεκαδακτύλου	Έκκριση γαστρικού οξέος	Κλινική εικόνα
 Πανγαστρίτιδα	<ul style="list-style-type: none"> <li>Χρόνια φλεγμονή</li> <li>Ατροφία</li> <li>Εντερική μεταπλασία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Φυσιολογική</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μειωμένη</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Γαστρικό έλκος</li> <li>Γαστρικός καρκίνος</li> </ul>
 Γαστρίτιδα του Άντρου (antral-predominant)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Χρόνια φλεγμονή</li> <li>Πολυμορφισμοί (polymorph activity)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Γαστρική μεταπλασία</li> <li>Χρόνια ενεργός φλεγμονή</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Αυξημένη</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Δωδεκαδακτυλικό έλκος</li> </ul>

Εικόνα 7. Συσχέτιση έκκρισης γαστρικού οξέος και τύπου γαστρίτιδας. Προσαρμογή από: Kusters et al., 2006 [13].



Εικόνα 8 α) Ανατομία ανθρώπινου στόμαχου β) Τοπολογία του πεπτικού (γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού) έλκους και του μη καρδιακού γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Προσαρμογή: Kayali et al., 2018 [36].

### 1.7.3 Πεπτικό Έλκος

Με τον όρο πεπτικό έλκος νοούνται τα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά έλκη, τα οποία είναι πληγές του βλεννογόνου του στομάχου ή του δωδεκαδακτύλου με διάμετρο 5 mm. Τα γαστρικά έλκη εμφανίζονται στα μικρότερης καμπυλότητας τοιχώματα του στομάχου, κατά την μετάβαση από το σώμα στο άντρο, όταν η παραγωγή οξέος είναι μειωμένη. Τα δωδεκαδακτυλικά συμβαίνουν στον δωδεκαδακτυλικό βολβό, περιοχή που εκτίθεται περισσότερο στο γαστρεντερικό οξύ, παρουσία υψηλής παραγωγής οξέος. Το πεπτικό έλκος είναι άμεσα συνδεδεμένο με την λοίμωξη από *H. pylori* καθώς περίπου το 90% παγκοσμίως που εμφανίζει έλκος, φέρει *H. pylori* λοίμωξη και η εκρίζωση του βακτηρίου μειώνει σημαντικά την επανεμφάνιση κάποιας μορφής έλκους και οδηγεί στην καθολική επούλωση των πληγών στους βλεννογόνους. Αντίθετα σε ασθενείς που δεν εκριζώθηκε το *H. pylori* παρατηρείται υποτροπή του έλκους εντός ενός έτους, περίπου στους μισούς [44]. Η ανάπτυξη του πεπτικού έλκους σχετίζεται με πολλούς παράγοντες που αφορούν στον ξενιστή και στο βακτήριο και αν δεν αντιμετωπιστεί νωρίς, είναι πολύ πιθανό να δημιουργήσει γαστρικό καρκίνο [13].

### 1.7.4 Γαστρικός Καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος και το λέμφωμα MALT είναι το αποτέλεσμα του επίμονου μικροβιακού αποικισμού [49] καθώς αναπτύσσονται στους θετικούς *H. pylori* ασθενείς δεκαετίες μετά την μόλυνση του *H. pylori* [50]. Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 700.000 έως 900.000 νέα περιστατικά παγκοσμίως. Τα ποσοστά επιβίωσης είναι χαμηλά, ποικίλλουν γεωγραφικά και εμφανίζονται περισσότερο στους άντρες από ότι στις γυναίκες [50]. Είναι η δεύτερη αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο, με 738.000 θανάτους παγκοσμίως και η τέταρτη πιο κοινή μορφή καρκίνου [30]. Η χρόνια φλεγμονή που επιφέρει η μόλυνση του *H. pylori* οδηγεί σε απώλεια της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του βλεννογόνου του στομάχου, με καταστροφή των γαστρικών αδενίων και τη δημιουργία ίνωσης και επιθηλίου εντερικού τύπου (εντερικής μεταπλασίας). Η *H. pylori* μόλυνση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης αδενοκαρκινώματος ως επακόλουθο της ατροφικής γαστρίτιδας και της εντερικής μεταπλασίας σε *H. pylori* θετικούς σε σύγκριση με τους μη μολυσμένους με το ελικοβακτήριο του πυλωρού. Επιπλέον η προληπτική εκρίζωση του *H. pylori* έχει δειχθεί ότι μπορεί να μειώσει δραστικά την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου [13].

Υπάρχουν δύο ιστολογικά διακριτές μορφές αδενοκαρκινώματος του στομάχου, αυτή του διάχυτου τύπου και αυτή του εντερικού τύπου, με διαφορετικές επιδημιολογικές και παθοφυσιολογικές ιδιότητες. Το αδενοκαρκίνωμα διάχυτου τύπου συναντάται σε νεαρότερα άτομα,

ανεξαρτήτου φύλου και χαρακτηρίζεται από διηθητικά νεοπλασματικά κύτταρα που δεν συνδέονται με την δημιουργία αδενίων και εντερική μεταπλασία. Αντίθετα, το εντερικού τύπου αδenoκαρκίνωμα είναι επικρατέστερο, εμφανίζεται περισσότερο στους ηλικιωμένους άνδρες και εξελίσσεται σταδιακά μέσω ιστολογικών γεγονότων. Ξεκινάει από την χρόνια γαστρίτιδα και ακολουθείται από ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία, δυσπλασία και αδenoκαρκίνωμα του βλεννογόνου. Η λοίμωξη από *H. pylori* συμβάλει και στους δύο τύπους αδenoκαρκινώματος αλλά στον εντερικού τύπου οι μηχανισμοί εξέλιξης της νόσου χαρακτηρίζονται καλύτερα. Επίσης, οι γαστρικοί καρκίνοι ταξινομούνται σύμφωνα με την τοπολογία τους στον στόμαχο και διακρίνονται σε αυτούς της καρδιακής και της μη-καρδιακής μοίρας. Το *H. pylori* παραμένει ο πιο ισχυρός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη περιφερικών (μη καρδικού) τύπου καρκίνου [50], ωστόσο ο μηχανισμός καρκινογένεσης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος [49]. Παρόλο που το *H. pylori* αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, μόλις το 1-2 % των φορέων τελικά θα εμφανίσει νεοπλασία. Ο κίνδυνος καρκίνου σχετίζεται με την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών του ίδιου του βακτηρίου, την φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιστή και των λοιμοτοξικών παραγόντων του βακτηρίου. Οι κύριοι λοιμοτοξικοί βακτηριακοί παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεια σχετίζονται με αυξημένες αλλοιώσεις στο επιθήλιο είναι οι πρωτεΐνες CagA και VacA, μια σειρά γονιδίων που ελέγχουν την αλληλεπίδραση με τα γαστρικά κύτταρα τα οποία συναντώνται στο νησίδιο παθογένειας *cag* (*cagPAI*) και κωδικοποιούν για ένα εκκριτικό σύστημα τύπου-4, καθώς και γονίδια που εμπλέκονται στην προσκόλληση στο γαστρικό επιθήλιο (*babA*, *sabA* κ.λπ.).

Η ογκοπρωτεΐνη CagA συσχετίζεται με την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου μάλλον λόγω της ικανότητας της να προκαλεί αποδιαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων διαταράσσοντας την κυτταρική προσκόλληση και την κυτταρική πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα αυτά να οδεύουν προς την ανάπτυξη επιθηλιο-μεσεγχυματικού τύπου μετατροπής [30]. Τα *cagA*-θετικά στελέχη έχουν συσχετισθεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου στους ασθενείς γιατί προκαλούν προφλεγμονώδεις απαντήσεις, ενεργοποιώντας τον παράγοντα μεταγραφής STAT3 και οδηγώντας έτσι σε άτακτο πολλαπλασιασμό των γαστρικών κυττάρων [50]. Επιπλέον, τα εν λόγω στελέχη σχετίζονται με αυξημένη έκφραση IL-8 και επαγωγής φλεγμονής στον γαστρικό ιστό, μέσω της δράσης των γονιδίων του νησιδίου παθογένειας *cag* τα οποία είναι απαραίτητα για την απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-8. Αποσιώπηση των ίδιων γονιδίων μειώνει την ενεργοποίηση του καταρράκτη μεταγωγής σήματος του παράγοντα NF-κB και της MAPK κινάσης που ρυθμίζουν την φλεγμονώδη παραγωγή κυτταροκινών [42]. Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην έκβαση της νόσου, ιδιαίτερα με στελέχη CagA-θετικά, είναι η

διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι και το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή [30]. Η πρωτεΐνη VacA είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό πόρων και κενотоπίων και προκαλεί απόπτωση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Η BabA2 πρωτεΐνη ανήκει στις πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης που δεσμεύουν αντιγόνα Lewis b στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα και σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου [42]. Η φλεγμονώδης αντίδραση που επάγεται από την παρουσία του *H. pylori* οδηγεί σε δημιουργία συνθηκών οξειδωτικού στρες, οι οποίες αφ' ενός είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό βλαβών στην διπλή έλικα του DNA, αφ' ετέρου δε μειώνουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας, όπως για παράδειγμα το γαστρικό ασκορβικό οξύ που εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών [49], [51].

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η παραμονή του *H. pylori* μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης άλλων τύπων καρκίνου, όπως του αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου. Οι ίδιοι παράγοντες που προδιαθέτουν για γαστρικό καρκίνο, είναι πιθανό να επιδρούν προστατευτικά στους *H. pylori*-θετικούς φορείς έναντι του καρκίνου του οισοφάγου [42].

### 1.7.5 Λέμφωμα MALT

Τα MALT λεμφώματα εμφανίζονται σε ποσοστό μικρότερο του 1% σε *H. pylori* θετικούς φορείς, σχεδόν όλοι οι ασθενείς με Β-κυτταρικό λέμφωμα MALT φέρουν την *H. pylori* λοίμωξη, αλλά και όλοι οι *H. pylori* θετικοί ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης γαστρικού λεμφώματος MALT [50]. Φυσιολογικά, ο γαστρικός βλεννογόνος δεν περιέχει λεμφικό ιστό, ωστόσο το MALT εμφανίζεται ως απάντηση στην εμμένουσα λοίμωξη μετά τον αποικισμό του *H. pylori*. Από αυτόν τον ιστό προκύπτει ένας μονοκλωνικός πληθυσμός Β λεμφοκυττάρων, ο οποίος πολλαπλασιάζεται αργά και δημιουργεί το χαμηλόβαθμης βλάβης (low grade) λέμφωμα MALT. Το λέμφωμα MALT είναι χαμηλής κακοήθειας, όπως το 40% των γαστρικών λεμφωμάτων. Για την πρόγνωση της νόσου, σημαντικό ρόλο παίζει η παρουσία μετατόπισης t(11;18) (q21;q21), που σχετίζεται με την σύντηξη δύο γονιδίων API2-MALT1, σχηματίζοντας ένα ογκογονίδιο, του οποίου το API2 τμήμα συμμετέχει στην απόπτωση και το MALT1 τμήμα διαδραματίζει το ρόλο μιας κασπάσης με μη αποσαφηνισμένη βιολογική λειτουργία. Αυτό το είδος λεμφώματος δεν υποστρέφει σε θεραπεία επιτυχημένης εκρίζωσης του *H. pylori*, όπως συμβαίνει στην πλειονότητα των Β-κυτταρικών MALT λεμφωμάτων. Επιπλέον ένα μικρό ποσοστό (10-35%) των περιπτώσεων δεν υποστρέφει πλήρως και γι' αυτό τον λόγο απαιτείται μακροχρόνια παρακολούθηση [52].



## 1.8 Διάγνωση

Οι διαθέσιμες δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση του *H. pylori* διακρίνονται σε επεμβατικές και μη επεμβατικές. Για τις επεμβατικές μεθόδους χρειάζεται ενδοσκόπηση του ανώτερου πεπτικού συστήματος και η διάγνωση βασίζεται καταρχήν, στο τεστ ταχείας δοκιμασίας ουρεάσης (RUT) στις γαστρικές βιοψίες, που βασίζεται στην χρωματική αποτύπωση της αλλαγής του pH, λόγω της δράσης της ουρεάσης, αλλά επιβεβαιώνεται και με ιστολογική εξέταση των γαστρικών βιοψιών των ασθενών με χρώσεις Giemsa για την ανίχνευση του βακτηρίου και αιματοξυλίνης-εωσίνης για την αξιολόγηση της βαρύτητας και δραστηριότητας της επαγόμενης φλεγμονής στο χόριο και των αλλοιώσεων του βλεννογόνου. Επίσης, μπορούν να απομονωθούν τα επιμολύνοντα κλινικά στελέχη από τις γαστρικές βιοψίες και να χρησιμοποιηθούν μοριακές τεχνικές PCR ή FISH για τον γενετικό χαρακτηρισμό των στελεχών. Στις μη επεμβατικές περιλαμβάνονται εξέταση ουρίας-αναπνοής (Urea breath test-UBT) που βασίζεται στην ανίχνευση του εκπνεόμενου CO<sub>2</sub> κατόπιν υδρόλυσης της ουρίας σε NH<sub>3</sub> και CO<sub>2</sub>. Παλαιότερα, αλλά όχι πλέον, γινόταν και προσδιορισμός αντισωμάτων IgG και IgA για το *H. pylori* στον ορό ή και στα ούρα των ασθενών, αλλά η μέθοδος έχει εγκαταλειφθεί καθώς δεν μπορεί να διακρίνει την ενεργό από την παλαιά ή εκκριζοθείσα λοίμωξη. Επιπλέον πραγματοποιούνται και τεστ κοπράνων για την ανίχνευση των αντιγόνων του *H. pylori*. Συνήθως προτείνεται συνδυασμός μεθόδων για την έγκυρη διάγνωση ενώ η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως η εμπειρία ή οι διαθέσιμες κλινικές υποδομές. Για παράδειγμα σε νοσοκομειακούς χώρους πραγματοποιείται συνήθως γαστροσκόπηση και ακολουθεί ιστοπαθολογική αξιολόγηση του βιοπτικού υλικού [53].

## 1.9 Θεραπεία

Οι θεραπείες για το *H. pylori* βασίζονται στην χρήση αντιβιοτικών και παρ' όλο που το ελικοβακτήριο του πυλωρού εμφανίζει ευαισθησία σε πολλά αντιβιοτικά *in vitro*, η μεμονωμένη χορήγηση τους *in vivo* συχνά αποτυγχάνει στην εκρίζωση του. Για το λόγο αυτό επιβάλλεται συνδυαστική λήψη αντιβιοτικών, τα οποία χορηγούνται σε υψηλές δόσεις σε συνδυασμό με αντιεκκριτικούς παράγοντες (αναστολείς αντλίας πρωτονίων- PPI), για την αύξηση του γαστρικού pH. Οι PPI όπως και οι ανταγωνιστές υποδοχέων H<sub>2</sub> είναι αποτελεσματικοί, αναστέλλοντας την αντλία εκκρίσεως γαστρικού οξέος, δηλαδή την H<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>ATPase που βρίσκεται στα τοιχώματα των κυττάρων του στόμαχου. Μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P40 το οποίο έχει σημαντικό ρόλο για την αλληλεπίδραση τους με άλλα φάρμακα και το CYP2C19, του οποίου ο γονότυπος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση οξέων και στην εκρίζωση του

*H. pylori*. Για την επιτυχημένη εκρίζωση του *H. pylori* χρησιμοποιούνται συνδυασμοί των αντιβιοτικών όπως τετρακυκλίνη, αμοξικιλίνη, κλαριθρομυκίνη, μετρονιδαζόλη, λεβοφλοξασίνη, ριφαμπουτίνη, άλατα βισμούθιου σε χώρες όπου είναι διαθέσιμο και PPI σε συνδυασμό. Συγκεκριμένα, σαν πρώτη γραμμή θεραπείας χορηγείται συνήθως τριπλή θεραπεία, όπου συνδυάζονται δυο αντιβιοτικά: αμοξικιλίνη με κλαριθρομυκίνη ή αμοξικιλίνη και λεβοφλοξασίνη και σε περίπτωση αποτυχίας λόγω υφιστάμενης αντοχής έναντι της μακρολίδης ή της φθόριοκινολόνης μπορεί να χορηγηθεί μετρονιδαζόλη με άλατα βισμούθιου και κάποιο PPI. Σε περιπτώσεις αποτυχίας λόγω παρουσίας πολλαπλής αντοχής προτείνεται η τετραπλή θεραπεία με χρήση, PPI, αλάτων βισμούθιου και τετρακυκλίνης και μετρονιδαζόλης, επειδή εμφανίζει υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Δεν υπάρχει κοινά αποδεκτός τρόπος θεραπείας παγκόσμια [54] και για το λόγο αυτό υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές που εφαρμόζονται ανά χώρα και ήπειρο, όσον αφορά τον συνδυασμό των αντιβιοτικών, την δοσολογία, την διάρκεια και το τρόπο χορήγησης των αντιβιοτικών (ταυτόχρονα ή το ένα μετά το άλλο) [55]. Η αντοχή αποτελεί σημαντικό πρόβλημα όπως και στα άλλα βακτήρια [54], έτσι και το *H. pylori* παρουσιάζει υψηλή αντοχή έναντι ορισμένων αντιβιοτικών όπως στην κλαριθρομυκίνη (15-35%) και στην μετρονιδαζόλη (35-40%) και στη λεβοφλοξασίνη (10-20%) εξαιτίας της ευρείας χρήσης τους από τον γενικό πληθυσμό για άλλες λοιμώξεις, κυρίως του αναπνευστικού.

Εξαιτίας των σοβαρών γαστρικών νόσων αλλά και της αυξημένης πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου, η δημιουργία εμβολίων είναι επιτακτική. Από τις αρχές της δεκαετίας του '90 έχουν γίνει προσπάθειες ανάπτυξης εμβολίων και δοκιμές τους σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους, χωρίς όμως επιτυχία και έτσι δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια για την *H. pylori* λοίμωξη. Υποψήφια εμβόλια που έχουν αναπτυχθεί με σκοπό κυρίως την πρόληψη αλλά ορισμένα και την θεραπεία, βρίσκονται όμως σε προκλινικό και κλινικό στάδιο μελετών, ορισμένα σε φάση I και II, ενώ τέλος ένα ανασυνδυασμένο εμβόλιο *H. pylori* για χορήγηση από στόματος βρίσκεται σε φάση III κλινικών δοκιμών [56].

Τα προβιοτικά θεωρούνται ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται στην πρόληψη και ως εναλλακτική θεραπεία πολλών γαστρεντερικών λοιμώξεων και της λοίμωξης από *H. pylori* [55]. Χορήγηση γαλακτοβακίλλων σε πειραματικά μοντέλα λοίμωξης έχει δείχθει ότι μπορεί να μειώσει τα επίπεδα αποικισμού του *H. pylori* και της συνεπαγόμενης φλεγμονής [57]. Η εξάλειψη της λοίμωξης του ελικοβακτηρίου του πυλωρού από έναν πληθυσμό με τη βοήθεια αντιβιοτικών, είναι σημαντική λόγω του υψηλού επιπολασμού του αλλά και των επιπτώσεων του σε άλλες ασθένειες [54]. Η επιπλέον πρόληψη των μολύνσεων μέσω της βελτίωσης του βιοτικού επιπέδου ενδεχομένως να συνδέονται και με την ελάττωση των κρουσμάτων γαστρικού καρκίνου παγκοσμίως [42].

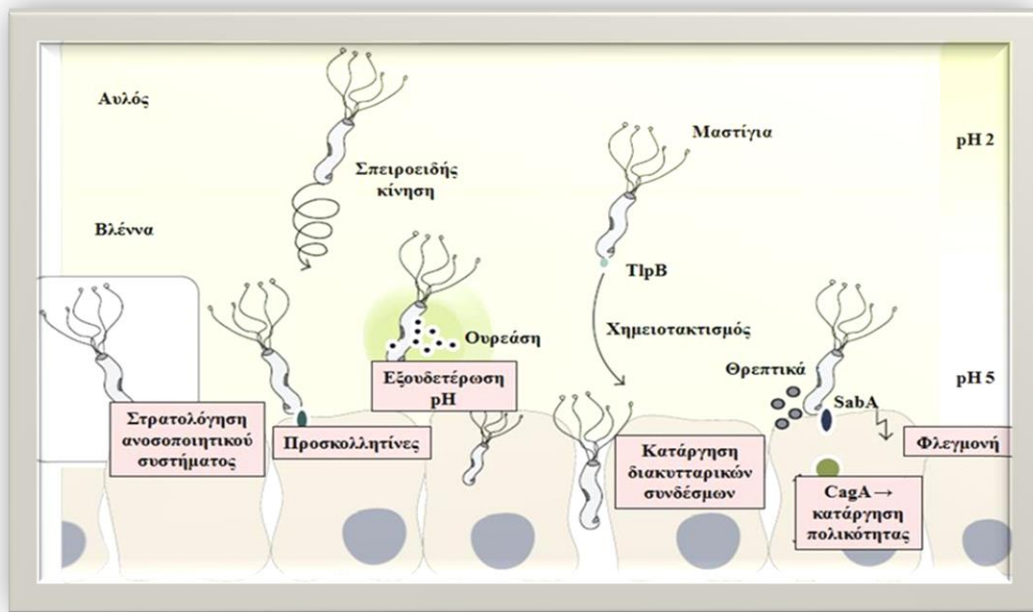
## 1.10 Παθογένεια και Παράγοντες Παθογένειας του *H. pylori*

Πολλοί παράγοντες σχετίζονται με τον αποικισμό του *H. pylori* στον ξενιστή, την εδραίωση του και τους μηχανισμούς παθοφυσιολογίας [45]. Το *H. pylori* θεωρείται εξωκυτταρικό βακτήριο καθώς εισερχόμενο στον οργανισμό παρασιτεί εντός της γαστρικής βλέννας και δεν αλληλοεπιδρά κατευθείαν με τα κύτταρα του ξενιστή. Παρά την πρόκληση ανοσολογικής απάντησης και την πρόκληση πολλών γαστρικών περιβαλλοντικών αλλαγών, το *H. pylori* καταφέρνει να αποικίσει επίμονα και για μεγάλα χρονικά διαστήματα τον ανθρώπινο στόμαχο, λόγω των πολλαπλών μικροβιοκτόνων ιδιοτήτων του [50]. Μερικοί από τους παράγοντες που καθορίζουν στον επιτυχή αποικισμό του βακτηρίου είναι το ελικοειδές σχήμα του και η έκλυση ουρεάσης, τα μαστίγια που του παρέχουν κινητικότητα και διεισδυτικότητα, βοηθώντας το να αλληλεπιδρά υποβλέννια με τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα βαθιά μέσα στα γαστρικά αδένια, η ικανότητα της BabA να εξασφαλίζει την προσκόλληση αντιγόνων O της ομάδας αίματος Lewis B (LE<sup>B</sup>) συμβάλλοντας στην παθογένεια και τέλος η ικανότητα του για ανοσοδιαφυγή [45].

Όπως όλα τα εισερχόμενα βακτήρια που στοχεύουν στον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα, έτσι και *H. pylori* θα πρέπει να επιβιώσουν στο ισχυρά όξινο περιβάλλον του στομάχου [58]. Το *H. pylori* το επιτυγχάνει αυτό με το ένζυμο της ουρεάσης που διασπά την ουρία προς αμμωνία και CO<sub>2</sub> με σκοπό την αλκαλοποίηση του pH [25]. Το *H. pylori* διαθέτει εννιά γονίδια που παράγουν κυτταροπλασματική ουρεάση και κωδικοποιούν τις υπομονάδες UreA (26.5 kDa) και UreB (62 kDa). Το *H. pylori* προσλαμβάνει ουρία από ένα κανάλι πρωτονίων και από την υδρόλυση της η παραγόμενη αμμωνία δημιουργεί ουδέτερο pH στην γύρω περιοχή του βακτηρίου, προκαλώντας βλάβη στα κύτταρα του ξενιστή. Στην συνέχεια η αμμωνία εισέρχεται στον κύκλο του αζώτου και ενσωματώνεται με πρωτεΐνες [58]. Επιπλέον, η αμμωνία αλληλοεπιδρά με χημικούς μεσολαβητές των ουδετερόφιλων, όπως για παράδειγμα την μυελοϋπεροξειδάση επιδρώντας στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου. Τέλος, το σύμπλοκο της ουρεάσης είναι εξαιρετικά σημαντικό για την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή έναντι του *H. pylori* [59], [58].

Η ουρία και τα διτανθρακικά ιόντα αποτελούν χημειοτακτικούς παράγοντες που κατευθύνουν την μετάβαση του *H. pylori* από τον αυλό στο γαστρικό βλεννογόνο (Εικόνα 9). Τον σημαντικό ρόλο σε αυτήν την μετακίνηση παίζουν τα μαστίγια του *H. pylori* που του επιτρέπουν να κινούνται μέσα στην παχιά στρώση της βλέννας και η χαρακτηριστική σπειροειδής του κίνηση [21], [58]. Το *H. pylori* μεταναστεύει προς τον βλεννογόνο επειδή εκεί οι τιμές του pH ανεβαίνουν και αυτό το βοηθάει να επιβιώσει. Όμως η παχύρρευστη βλέννα δυσκολεύει την προσέλευση των θρεπτικών συστατικών που χρειάζεται το *H. pylori* οπότε για να μπορέσει να επιβιώσει εκκρίνει υδρολυτικά ένζυμα [40].

Τελικά, το 20% του πληθυσμού του βακτηρίου προσκολλάται στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Η προσκόλληση επιτυγχάνεται με μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης, τις προσκολλητίνες όπως BabA, SabA, AlpA, AlpB, HopZ, και OipA που βρίσκονται στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων. Πρόκειται για μια διαδικασία η οποία προκαλεί βλάβες στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή και εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος [50]. Η κλινική έκβαση της λοίμωξης από *H. pylori* εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν το βακτήριο, τον ξενιστή αλλά και το περιβάλλον, οι οποίοι συνδέονται με το πρότυπο και τη βαρύτητα της γαστρίτιδας [42] και συγκεντρώνονται στον πίνακα 2.



Εικόνα 9. Μοριακοί μηχανισμοί εδραίωσης της *H. pylori* λοίμωξης στο γαστρικό περιβάλλον. Προσαρμογή: Bauer and Meyer, 2011 [50].

Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ασθενειών από <i>H. pylori</i>	Συντελεστής ή Μηχανισμός
<u>Ξενιστής</u>	Ηλικία Φύλο (πιο επιρρεπείς οι άντρες) Πολυμορφισμοί γονιδίων IL-1 Πολυμορφισμοί γονιδίων IL-10 Πολυμορφισμοί του γονιδίου PTPN11 Πολυμορφισμοί των Nod1/ Nod2 Τύποι γονιδίων TLR2 και TLR4 Πολυμορφισμοί γονιδίου αυτοφαγίας Atg16L1 Απλότυπος HLA Γαστρική βλέννα
<u>Βακτήριο</u>	<i>CagPAI</i> Πολυμορφισμοί CagA EPIYA Πολυμορφισμοί <i>vacA</i> Ουρεάση Πεπτιδογλυκάνη Εξωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες HomB, BabA, SabA SabB, OipA, AlpA, AlpB, HopZ
<u>Περιβάλλον</u>	<u>Διατροφικές συνήθειες:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• κατανάλωση κρέατος και δημιουργία νιτροσαμινών</li> <li>• Κατανάλωση αλατιού κυρίως στην Ασία</li> </ul> Χρήση αντιβιοτικών Κάπνισμα Αλκοόλ Στελέχη CagA <sup>+</sup> (CagA- θετικά στελέχη) Γεωγραφική περιοχή

Πίνακας 2. Συγκεντρωτική λίστα παραγόντων που επιδρούν στη κλινική έκβαση της *H. pylori* λοίμωξης. Προσαρμογή: Bridge και Merrell, 2013 [46]. Οι εξωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες θεωρούνται μεμβρανικοί παράγοντες παθογένειας. Η ουρεάση, η *VacA* και η *CagA* εκκρινόμενοι παράγοντες παθογένειας. Η πεπτιδογλυκάνη, η *CagA* και η φωσφορυλίωση της διακρίνονται ως μεταφερόμενοι.

### 1.10.1 Νησίδιο Παθογένειας *cag* (*cagPAI*) και Ενδοτοξίνη CagA

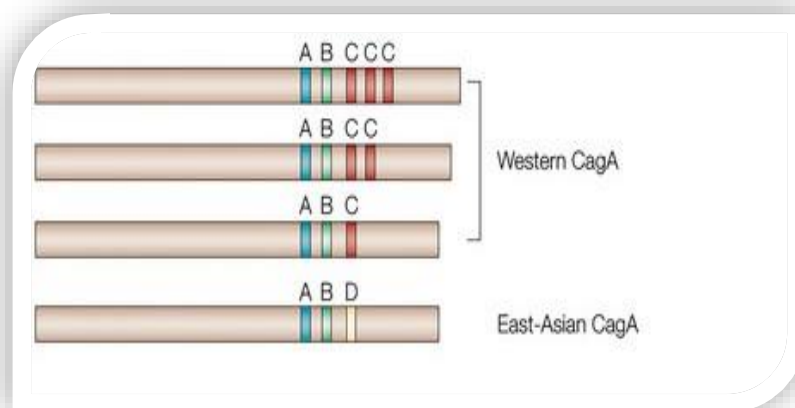
Αν και η μόλυνση με *H. pylori* σχεδόν πάντα οδηγεί σε χρόνια ενεργό γαστρίτιδα, η πλειοψηφία των φορέων δεν αναπτύσσουν άλλες επιπλοκές ή κλινικά συμπτώματα της λοίμωξης. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα πως ορισμένα βακτηριακά στελέχη είναι πιο λοιμοτοξικά από άλλα. Η αυξημένη παθογένεια κάποιων στελεχών συσχετίστηκε με την ικανότητα των λοιμοτοξικών στελεχών να επάγουν μορφο-κινητικές αλλαγές, σχηματισμό κενοτοπίων και διαδοχική εκφύλιση κυττάρων που καλλιεργούνται *in vitro* [49]. Αυτή η δραστηριότητα συνδέθηκε με την παρουσία της πρωτεΐνης CagA μιας ενδοτοξίνης μοριακού βάρους 120-140 kDa [46]. Η CagA είναι ο πιο ευρύτερα και καλύτερα μελετημένος παράγοντας παθογένειας του *H. pylori* και ο ρόλος της είναι πολυπαραγοντικός [30]. Είναι πρωτεΐνη υψηλής ανοσογονικότητας [60] και κωδικοποιείται από το γονίδιο *cagA*, γονίδιο A που σχετίζεται με κυτταροτοξίνες [46]. Αυτό το γονίδιο βρίσκεται στο 50-70% των στελεχών του *H. pylori*. Αποτελεί δείκτη παρουσίας του νησιδίου παθογένειας (Pathogenicity Island) *cagPAI*, οριζόντιας γονιδιωματικής θέσης, που πιστεύεται πως εισήχθη από άγνωστο οργανισμό. Ουσιαστικά είναι ένα σύμπλεγμα γονιδίων περίπου 40 kb που περιέχει τριάντα ένα γονίδια και κωδικοποιεί ένα εκκριτικό σύστημα τύπου 4. Τα στελέχη που φέρουν το *cagPAI* αναφέρονται ως CagA+ (ή CagA- θετικά), δηλαδή ως στελέχη CagA θετικά. Αντίστοιχα υπάρχουν και τα στελέχη CagA- (ή CagA- αρνητικά στελέχη) εφόσον απουσία του γονιδίου χαρακτηρίζονται ως στελέχη CagA αρνητικά [60]. Τα περισσότερα στελέχη φέρουν ένα πλήρες και συνεχόμενο *cagPAI*, αλλά το 10% των στελεχών εμφανίζει ένα ελλιπές και άρα μη πλήρως λειτουργικό *cagPAI*. Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρη η επίδραση αυτού στην έκβαση της νόσου. Η CagA χαρακτηρίζεται ως ο πλέον λοιμοτοξικός παράγοντας του *H. pylori*, σε ενήλικες, και έχει προταθεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια, αφού η παρουσία του γονιδίου *cagA* συσχετίζεται με ανάπτυξη πεπτικού έλκους, αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αυξημένης φλεγμονής και εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Σε αντίθεση, η ύπαρξη της CagA ή οποιουδήποτε άλλου μολυσματικού παράγοντα του *H. pylori* δεν σχετίζεται με την κλινική εικόνα [61]. Παγκοσμίως το 60% των CagA-θετικών στελεχών είναι υπεύθυνα για την λοίμωξη από *H. pylori*. Τα απομονωμένα στελέχη του βακτηρίου σε χώρες της Ασίας, είναι σχεδόν όλα CagA θετικά. Τα στελέχη που φέρουν *cagPAI* επάγουν τίτλους αντισωμάτων ενάντια στην πρωτεΐνη δείκτη CagA, στους ασθενείς. Παράλληλα, οι μολυσμένοι ασθενείς με CagA-θετικό στέλεχος παρουσιάζουν υψηλότερη φλεγμονώδη ανταπόκριση και έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ατροφικής γαστρίτιδας, πεπτικού έλκους ή γαστρικού καρκίνου σε σχέση με εκείνους που έχουν προσβληθεί από Cag-αρνητικό στέλεχος του *H. pylori*. Παρόλα αυτά, οι συγκεκριμένες σχετιζόμενες με *H. pylori* κλινικές εκφάνσεις έχουν εκδηλωθεί και σε ποσοστό του πληθυσμού που φέρει CagA-αρνητικό στέλεχος. Η CagA είναι μοριακά δομημένη με το αμινοτελικό

άκρο, που περιλαμβάνει το 70% του συνόλου της CagA και διακρίνεται σε περαιτέρω τομέα I, τομέα II και τομέα III και από ένα μη-δομημένο καρβοξυλικό άκρο που περιλαμβάνει από 3 -5 επαναλήψεις της αμινοξικής αλληλουχίας Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) και μεταβολές στο μοριακό βάρος της οφείλονται σε παρουσία ολιγοτέρων ή περισσότερων EPIYA περιοχών που χαρακτηρίζουν τα εκάστοτε βακτηριακά στελέχη [62].

Δεκαοχτώ από τις κωδικοποιημένες πρωτεΐνες με *cagPAI* χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία ενός εκκριτικού συστήματος τύπου IV (T4SS), μέσω του οποίου διεισδύουν οι βακτηριογόνοι παράγοντες στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Έτσι, διευκολύνεται η ενδοκυττάρια μεταφορά της πρωτεΐνης CagA, πεπτιδογλυκάνης και ενδεχομένως και άλλων βακτηριακών παραγόντων από το *H. pylori*, μέσα στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή [30]. Η CagA, είναι η μόνη γνωστή πρωτεΐνη που εκκρίνεται από το T4SS και μέσω αυτού μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή [62], απορρυθμίζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η χρωμοσωμική ακεραιότητα. Η CagA επηρεάζει την ρύθμιση της κυτταρικής πολικότητας και οι πεπτιδογλυκάνες επάγουν την ενεργοποίηση της φλεγμονής μέσω του NF-κB. Τόσο η CagA όσο και οι πεπτιδογλυκάνες είναι υπεύθυνες για την επαγωγή προφλεγμονώδους απόκρισης που εξαρτάται από το σύστημα T4SS. Η ικανότητα της CagA να επάγει την έκφραση της IL-8 δεν είναι ίδια για όλα τα στελέχη CagA+ [30]. Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις που ενεργοποιούνται από την CagA, όπως η έκκριση κυτταροκινών IL-6, IL-11, ενεργοποιούν το μονοπάτι του STAT3 που παίζει ρόλο στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου [63]. Μετά την έγχυση της CagA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην μεμβράνη του κυτταροπλάσματος. Ο μηχανισμός ενδοκυτταρικής εντόπισης εξαρτάται από την πρόσδεση της CagA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Σε συστήματα πολωμένων κυττάρων, η πρόσδεση της CagA εξαρτάται από ένα θετικά φορτισμένο μοτίβο τους K-Xp-R-X-R που προσδένεται με την φωσφατιδυλοσερίνη που βρίσκεται στον τομέα II του N-τελικού άκρου της CagA. Στα μη πολωμένα κύτταρα, σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της CagA στην μεμβράνη τους φαίνεται να παίζει το C-τελικό άκρο της και η αλληλεπίδραση της CagA με το σύμπλοκο κινασών PAR1/MARK [62].

Η πρωτεΐνη CagA, χαρακτηρίζεται ως πιθανή βακτηριακή ογκοπρωτεΐνη καθώς ιστοειδική διαγονιδιακή έκφραση της σε ποντίκια, προκαλεί πολλαπλές γαστρεντερολογικές και αιματολογικές κακοήθειες, όπως γαστρική υπερπλασία, γαστρικούς πολύποδες, αδenoκαρκίνωμα στομάχου και λεπτού εντέρου, λευχαιμία και λέμφωμα B-κυττάρων. Συγκεκριμένα, μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη νεοπλασιών, φαίνεται ότι διαδραματίζει η δυνατότητα φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης (Y) της CagA σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, καθώς έκφραση μη φωσφορυλιωμένης CagA στα

πειραματόζωα δεν προκάλεσε παθολογικές ανωμαλίες [30]. Η πρωτεΐνη CagA μετά την ενδοκυττάρια μεταφορά της από το T4SS, φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα τυροσίνης στα μοτίβα EPIYA, με ιεραρχικό τρόπο από κινάσες της οικογένειας Src και Abl [62]. Οι Src κινάσες ενεργοποιούνται και δρουν μόνο κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης, δηλαδή 0,5-2 ώρες, ενώ οι Abl κινάσες είναι ισχυρά ενεργοποιημένες στα αργότερα χρονικά σημεία μόλυνσης, δηλαδή στις 2-8 ώρες [64]. Από την αλληλουχία αμινοξέων που πλαισιώνει το μοτίβο EPIYA έχουν προσδιοριστεί τέσσερα διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης CagA, τα EPIYA-A (32 αμινοξέα), EPIYA-B (40 αμινοξέα), EPIYA-C (34 αμινοξέα) και EPIYA-D 47 (αμινοξέα). Τα στελέχη *H. pylori* που απομονώνονται σε Ευρώπη, Αμερική και Αυστραλία έχουν τα EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C και η πρωτεΐνη CagA αναφέρεται ως Δυτικού-τύπου CagA (Western CagA) ή ABC τύπου. Στο τμήμα EPIYA-C παρατηρείται διαφορετικός αριθμός επαναλήψεων μεταξύ των Western CagA, που παρίστανται το ένα δίπλα στο άλλο και επαναλαμβάνεται από μία έως τρεις φορές. Στις χώρες της Ανατολικής Ασίας συναντώνται τα μοτίβα EPIYA-A, EPIYA-B και EPIYA-D, όπου και η πρωτεΐνη αναφέρεται ως CagA της Ανατολικής Ασίας (East Asia CagA) ή ως ABD τύπου [65], [66] όπως απεικονίζεται στην εικόνα 10. Επειδή η ικανότητα σύζευξης των μοτίβων EPIYA στις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες εξαρτάται από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης, η κατάσταση φωσφορυλίωσης των μοτίβων επηρεάζει έντονα την παθολογική δράση της CagA [62]. Ο αριθμός των μοτίβων EPIYA-C φαίνεται να καθορίζει το επίπεδο φωσφορυλίωσης της CagA και επάγει αυξημένα επίπεδα κυτταροσκελετικών και κινητικών αλλοιώσεων, μετά από πειραματική *in vitro* *H. pylori* λοίμωξη επιθηλιακών κυττάρων. Η φωσφορυλίωση της CagA EPIYA-C απαιτείται για την πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου IL-8 ανεξάρτητα από τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων ομάδων στο καρβοξυ-τελικό άκρο [67]. Επιπλέον στους ενήλικες η παρουσία EPIYA-C αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την παρουσία δωδεκαδακτυλικού έλκους [61].



Εικόνα 10. Διαφοροποιημένα σημεία φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA. Προσαρμογή: Hatakeyama M., 2004 [70].



Δεν είναι μόνο η αλληλουχία στα μοτίβα της ακολουθίας που καθορίζουν την λοιμογόνο δράση της πρωτεΐνης CagA αλλά και ο αριθμός και η διακύμανση των σημείων φωσφορυλίωσης. Η αυξημένη φωσφορυλίωση των θέσεων EPIYA οδηγεί σε ενισχυμένη δέσμευση μιας άλλης ογκοπρωτεΐνης, φωσφατάση τυροσίνης, της SHP-2, η οποία απελευθερώνεται αφού δεσμευτεί η CagA και προκαλεί έντονες μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα του ξενιστή και κυτταρική επιμήκυνση γνωστή ως φαινότυπος “hummingbird” [68]. Ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται από ένα επίμηκες χαρακτηριστικό σχήμα και ταυτόχρονη αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων [62]. Έχουν βρεθεί μεταλλάξεις της SHP-2 σε ανθρώπινες κακοήθειες και η μεταλλαγή της οδηγεί σε ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, υποδεικνύοντας πως η SHP-2 εμπλέκεται στην ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος. Τα μοτίβα EPIYA στο γονίδιο *cagA* παίζουν σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση προερχόμενη από τη σύνδεση της CagA-SHP-2 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή [69]. Η SHP-2 συνδέει τη σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα με την ενεργοποίηση Erk1/2, που αποτελούν μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού MAP κινασών και το οποίο έχει αναφερθεί να σχετίζεται με την καρκινογένεση, προκαλώντας μιτογονικές αποκρίσεις. Το μονοπάτι Erk-MAPK παρουσιάζει ανώμαλη ενεργοποίηση μετά την σύνδεση της SHP-2 με την CagA, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις μορφολογικές αλλαγές στους ιστούς των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, μετά την σύνδεση SHP-2 με CagA παρατηρείται αποφωσφορυλίωση της FAK πρωτεΐνης, μια κινάσης η οποία σχετίζεται με την εστιακή πρόσφυση, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αποκολλώνται [68]. Επιπλέον, ενισχύεται η δράση της SHP-2 η ενεργοποίηση της οποίας από την CagA επάγει απόπτωση και όχι κυτταρικό πολλαπλασιασμό, λειτουργώντας σαν ενεργοποιητής αντίθετος προς την μεταγωγή σήματος μέσω του Ras και επομένως, η επαγωγή της απόπτωσης ενδέχεται να οφείλεται σε μη ισορροπημένα μιτογόνα σήματα που παράγονται από την σύνδεση SHP-2 με την CagA. Η χρόνια απώλεια των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, λόγω της απόπτωσης που προκαλείται από την CagA ίσως αποτελεί και την αιτία δημιουργίας της ατροφικής γαστρίτιδας, η οποία χαρακτηρίζεται από απώλεια γαστρικών αδένων και μειωμένη έκκριση γαστρικού οξέος. Η αλκαλοποίηση του γαστρικού pH τελικά θα διευκολύνει και την παραμονή του *H. pylori* στον ανθρώπινο στομάχο [70].

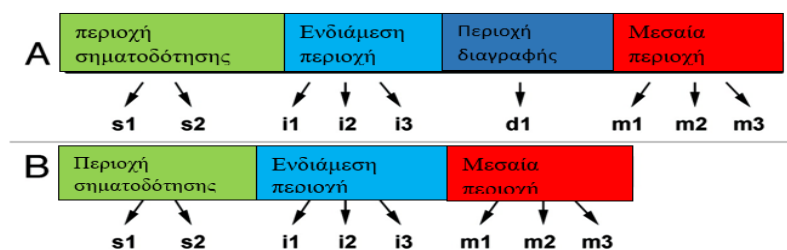
Επιπλέον, αλληλεπίδραση της CagA με την E-καδερίνη, οδηγεί σε μειωμένη διακυτταρική σύνδεση, αποσταθεροποιώντας το σύμπλοκο E-καδερίνης/β-κατενίνης. Η πρωτεΐνη β-κατενίνη που εκφράζεται ευρέως στα κύτταρα του ξενιστή, συνδεδεμένη με την CagA αποτελεί δυνητικό παράγοντα καρκινογένεσης, ανεξάρτητα της φωσφορυλίωσης της CagA. Η πυρηνική β-κατενίνη είναι προσδεμένη στην μεμβράνη και αποτελεί σημαντικό συστατικό των χασμοσυνδέσεων. Η κυτταροπλασματική β-κατενίνη αποτελεί μόριο σηματοδότησης στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος

Wnt. Μόλις αποσπαστεί ο αναστολέας GSK3β, η β-κατενίνη μεταφέρεται αφύσικα στον πυρήνα όπου επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Η β-κατενίνη παίζει σημαντικό ρόλο και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η παρεμπόδιση του σήματος β-κατενίνης στο έντερο οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των εντερικών κυττάρων και η απορυθμισμένη σηματοδότηση της συμβάλλει στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου [71]. Τέλος, η CagA μπορεί να επάγει χρωμοσωμική αστάθεια σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, καθώς το N-τελικό άκρο της CagA αλληλοεπιδρά με την όγκο κατασταλτική πρωτεΐνη απόπτωσης p53 (ASPP2). Η ASPP2 είναι πρωτεΐνη που επάγει απόπτωση μετά από σύνδεση και ενεργοποίηση της p53 και ενδεχόμενη αλληλεπίδραση με την CagA έχει ως αποτέλεσμα πρωτεασωμική αποικοδόμηση της p53 και κατά συνέπεια αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων του ξενιστή [72].

### 1.10.2 Εξωτοξίνη VacA

Ένας άλλος κύριος λοιμοτοξικός παράγοντας του *H. pylori* είναι η πρωτεΐνη VacA, που ανακαλύφθηκε το 1988 από τους Leunk και συν., [46] και αποτελεί μία κυτταροτοξική εξωτοξίνη που συμβάλει στην εγκατάσταση και στην παθογένεια της *H. pylori* λοίμωξης. Σε αντίθεση με την CagA, η VacA παράγεται σχεδόν από όλα τα βακτηριακά στελέχη γιατί κωδικοποιείται από το γονίδιο *vacA* το οποίο υπάρχει σε όλα τα *H. pylori* στελέχη [73]. Η ώριμη τοξίνη VacA 88 kDa εκκρίνεται ως διαλυτή πρωτεΐνη στον εξωκυττάριο χώρο ή μπορεί να μείνει προσκολλημένη στην επιφάνεια του βακτηρίου [74].

Τα *vacA* αλληλόμορφα εμφανίζουν παραλλαγές σε δύο μέρη του γονιδίου. Στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου, γνωστή ως περιοχή σηματοδότησης *s* και στην μεσαία περιοχή η επονομαζόμενη περιοχή *m* [73]. Οι περιοχές *s* και *m* έχουν διαφορετική κλινική συσχέτιση [75]. Τα αλληλόμορφα της *s* είναι τα *s1a*, *s1b* και *s2* και τα αλληλόμορφα της *m* είναι τα *m1* και τα *m2* και αποτελούν την αιτία παραγωγής διαφορετικών κυτταροτοξινών μεταξύ των στελεχών. Τα στελέχη με γονότυπο *s1m1*, παράγουν υψηλά επίπεδα τοξίνης [73] και συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο πεπτικού έλκους και γαστρικού αδενοκαρκινώματος [75]. Τα στελέχη με γονότυπο *s1m2* παράγουν μέτρια ή χαμηλά επίπεδα τοξίνης και τέλος αυτά που φέρουν γονότυπο *s2m2* δεν παράγουν καθόλου τοξίνη. Τα στελέχη *s1a* εμφανίζουν μεγαλύτερη διήθηση ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο. Ασθενείς μολυσμένοι με *s1a* εμφανίζουν δωδεκαδακτυλικό έλκος σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτούς που έχουν μολυνθεί από στελέχη *s1b* ή *s2*. Τα *m1* στελέχη προκαλούν μεγαλύτερη βλάβη στο γαστρικό επιθήλιο [73]. Ανάμεσα στις περιοχές *s* και *m*, βρίσκεται η ενδιάμεση *i* περιοχή, που φέρει τα αλληλόμορφα *i1*, *i2* και *i3* και ακριβώς δίπλα η περιοχή διαγραφής *d*, που είναι λιγότερο μελετημένη. Η τελευταία φέρει τα *d1* αν δεν υφίσταται διαγραφή και *d2* όταν υπάρχει διαγραφή 68-89 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 11) [46].



Εικόνα 11. Γενετικοί Πολυμορφισμοί του γονιδίου *vacA*. α) Δεν υφίσταται διαγραφή εφόσον φέρει το *d1*. β) Υπάρχει διαγραφή περιοχής *d2*. Προσαρμογή: Sipponen and Maaroos, 2015 [47].

Η πρωτεΐνη VacA παίζει ρόλο στον αρχικό αποικισμό του ξενιστή, καθώς η ειδικότητα σύνδεσης των κυττάρων του γονιδίου *vacA* καθορίζεται από 148 τμήματα αμινοξέων που εντοπίζονται στην περιοχή m. Έτσι, τα στελέχη που εκφράζουν τα ενεργά αλληλόμορφα μεταδίδονται ευκολότερα στον ξενιστή. Η VacA σχηματίζεται ως προτοξίνη 140 kDa και εκκρίνεται μέσω αυτομεταφερόμενης οδού. Η ώριμη τοξίνη υφίσταται περιορισμένη πρωτεολυτική διάσπαση σε δύο τμήματα, το p33 και το p55. Η προτοξίνη επεξεργάζεται περαιτέρω στο αμινοτελικό άκρο του p33 (33 kDa) και στο καρβοξυλικό άκρο του p55 (55 kDa). Τα θραύσματα p33 και p55 αντιπροσωπεύουν δύο υπομονάδες της VacA. Το θραύσμα p33 είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό πόρων, ενώ το p55 για την στοχευμένη σύνδεση των κυττάρων. Η VacA περιέχει μία υδρόφοβη περιοχή κοντά στο θραύσμα p33. Η ενδοκυττάρια μεταφορά της VacA γίνεται με την συσκευή Golgi. Μεσολαβούν πρωτεΐνες που διογκώνουν τα ενδοσώματα και δημιουργούνται κενοτόπια από την παρουσία της VacA, που σχηματίζονται από την ενσωμάτωση ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται με τους ενδοσωματικούς και λυσοσωματικούς βιοδείκτες Rab-7 και LAMP1 [74]. Μάλιστα η VacA πήρε το όνομα της από αυτήν την ικανότητα της να δημιουργεί κενοτόπια στο κυτταρόπλασμα των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων αλλά ο ρόλος τους στην παθογένεια, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί [75].

Η VacA εκτός από το ότι επάγει τον σχηματισμό κενοτοπίων, οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης [73]. Η σύνδεση της με τα κύτταρα στόχο αποτελεί κρίσιμο σημείο για την τοξικότητας της και χρησιμοποιεί διαφορετικούς υποδοχείς για να συνδεθεί με τον κάθε διαφορετικό τύπο κυττάρου επηρεάζοντας πληθώρα κυτταρικών τύπων όπως επιθηλιακά και T-κύτταρα, στοχεύοντας τα μιτοχόνδρια και τις αποπτωτικές οδούς. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικά οργανίδια για την διαδικασία της απόπτωσης, απελευθερώνοντας κυτόχρωμα-c προς το κυτταρόπλασμα και με αυτό τον τρόπο ενεργοποιώντας την οδό μεταγωγής σήματος που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο [75]. Η VacA σχηματίζει πόρους στην μιτοχονδριακή επιφάνεια προκαλώντας απόπτωση, αν και ο μηχανισμός που στοχεύει η VacA στα μιτοχόνδρια δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί [46].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι φαίνεται πως υφίσταται μια ανταγωνιστική δράση μεταξύ των δύο τοξινών CagA και VacA [75], καθώς έχει δειχθεί πως η CagA αναστέλλει την απόπτωση και τον σχηματισμό των κυστιδίων που προάγονται από την VacA. Η πρωτεΐνη CagA μετά την επιτυχή είσοδο και φωσφορυλίωση επάγει ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κB και παραγωγή της IL-8 ως μέσου για την αναστολή της απόπτωσης που προκαλείται από την VacA [46]. Παράλληλα, κατά την διάρκεια της *H. pylori* λοίμωξης η VacA προάγει την συσσώρευση της CagA στα επιθηλιακά κύτταρα [76].

## 2. Ανοσοποιητικό Σύστημα

### 2.1 Ανοσιακή Απόκριση και Ανοχή έναντι του *H. pylori*

Η ανοσολογική απάντηση του γαστρικού βλεννογόνου απέναντι στο *H. pylori*, ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ασθενών [77] ωστόσο προκαλεί μια συνεχόμενη γαστρική φλεγμονή σχεδόν σε όλα τα άτομα, ακόμα και αν δεν εκδηλώνουν συμπτώματα [13]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η *H. pylori* λοίμωξη παραμένει καθ' όλη την διάρκεια ζωής του ξενιστή ελλείψει θεραπείας εκρίζωσης, διότι το ανοσοποιητικό σύστημα αποτυγχάνει στην εξάλειψη της. Ο αποικισμός από το *H. pylori* προκαλεί ισχυρή ανοσολογική απάντηση, δημιουργώντας ένα χρόνια φλεγμονώδες περιβάλλον γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη οξύτητα του pH του στομάχου που μπορεί να ευνοεί την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Η παρατεταμένη διατήρηση της φλεγμονής μπορεί να συντελεί στη μείωση των επιπέδων βιταμίνης C στο γαστρικό χυμό, σε αναστολή της έκκρισης γαστρικού οξέος, ευνοώντας την εμφάνιση γαστρικής ατροφίας και εντερικής μεταπλασίας, που χαρακτηρίζονται ως προκαρκινικές βλάβες [78]. Αν και οι πρωτεΐνες του *H. pylori* εντοπίζονται στο χόριο του βλεννογόνου του στομάχου και θεωρείται παθογόνο που εντοπίζεται κυρίως στο εξωκυττάριο στρώμα του βλεννογόνου, ωστόσο μελέτες έχουν περιγράψει την ενδοκυττάρια και διακυτταρική παρουσία του βακτηρίου στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε ζωικά πρότυπα λοίμωξης σε ποντίκια και πρωτεύοντα, παρουσία ατροφικής γαστρίτιδας [79]. Επίσης, έχει αναφερθεί η περίπτωση ανίχνευσης του βακτηρίου σε επαφή με ερυθροκύτταρα εντός των μικροαγγείων στο χόριο του βλεννογόνου [80], όπως και σε επαφή με τα ανοσοκύτταρα της περιοχής του γαστρικού βλεννογόνου στην πλειοψηφία των περιπτώσεων της γαστρίτιδας και του καρκίνου [81].

Η λοίμωξη από *H. pylori* διεγείρει την φυσική και την επίκτητη, την χυμική και την κυτταρική ανοσία [82]. Τα αντιγόνα που παράγονται από το *H. pylori* αναγνωρίζονται από υποδοχείς της φυσικής ανοσίας, κυρίως τους TLRs και NOD, οι οποίοι βρίσκονται στα αντίστοιχα κύτταρα φυσικής ανοσίας, όπως στα μακροφάγα και δενδριτικά. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων προκαλεί την χυμική και κυτταρική ανοσολογική απάντηση. Η διέγερση των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων επιτρέπει την ενεργοποίηση και στρατολόγηση των λεμφοκυττάρων και την ανάπτυξη των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα και τα υπόλοιπα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ενεργοποιούν τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα [83]. Στην *H. pylori* λοίμωξη στρατολογούνται φλεγμονώδη κύτταρα και διαμεσολαβητές, ενεργοποιείται ο παράγοντας φλεγμονής NF-κB και εκκρίνονται φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες [78], με

ταυτόχρονη ενεργοποίηση παραγόντων μεταγραφής στα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν χημειοτακτικά μόρια όπως η IL-8, που οδηγεί σε περαιτέρω στρατολόγηση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων πρωτοστατούντων των ουδετερόφιλων τα οποία φαγοκυτταρώνουν και παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) [83]. Ο ξενιστής εκτίθεται σε οξειδωτικό στρες που φαίνεται πως προκύπτει από μια ενεργή ανοσοαπόκριση της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ως απάντηση στην παρουσία του *H. pylori*, αυξάνει την παραγωγή ROS και δραστικών ριζών αζώτου (RNS). Αυτά προκαλούν βλάβη στα κύτταρα του ξενιστή, ευνοώντας την εμφάνιση μεταλλάξεων που μπορούν να διευκολύνουν την καρκινογόνο διαδικασία. Επιπλέον η έκφραση των μεσολαβητών της ανοσολογικής απόκρισης μπορεί να ρυθμιστεί από miRNAs και φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορεί να αλλάξει την έκφραση των miRNAs. Καθώς διαμορφώνεται η ανοσολογική απάντηση που προκαλείται από τα βακτήρια, αλλάζει το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης στο γαστρικό βλεννογόνο, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς, την φλεγμονώδη και ανοσολογική απόκριση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση [78]. Ιδιαίτερα στην περίπτωση της χρόνιας γαστρίτιδας, αναμένεται αυξημένη γονιδιωματική έκφραση των κυτταροκινών λόγω της αυξημένης διείσδυσης των ανοσοκυττάρων και ειδικά των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων. Πιστεύεται πως οι κυτταροκίνες που παράγονται από ανοσοποιητικά και μη κύτταρα ως απόρροια της ανοσοαπόκρισης που ξεκινά από το *H. pylori*, ευθύνονται για την συνεχιζόμενη και άρα χρόνια φλεγμονή [77]. Οι κυτταροκίνες που τα επίπεδα τους αυξάνονται στους στόμαχους των μολυσμένων ασθενών είναι οι IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-18 ενώ η IL-4 δεν ανιχνεύεται στους περισσότερους ασθενείς [84].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ελικοβακτήριο του πυλωρού διεγείρει μια φλεγμονώδη αντίδραση του γαστρικού βλεννογόνου και αντιστέκεται στην ανοσολογική άμυνα του ξενιστή. Για να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που βρίσκονται πίσω από αυτά τα φαινόμενα, μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του ελικοβακτηρίου του πυλωρού με διάφορους τύπους ανοσοκυττάρων. Επειδή το *H. pylori* ζει στον γαστρικό βλεννογόνο αλλά τυπικά δεν διαπερνά τον επιθηλιακό γαστρικό φραγμό, η επαφή του με τα φαγοκύτταρα εικάζεται αρκετά περιορισμένη. Ωστόσο πολλές μελέτες αποδεικνύουν την κατάποση του *H. pylori* από φαγοκύτταρα στον ανθρώπινο γαστρικό ιστό. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση του *H. pylori* με τα ένδο-επιθηλιακά T κύτταρα εμφανίζονται συχνότερα [84]. Η λοίμωξη από *H. pylori* οδηγεί σε Th1 ανοσιακή απόκριση, καθώς τα κύτταρα Th1 αναπτύσσονται κυρίως μετά από λοιμώξεις με ενδοκυττάρια βακτήρια, όπως είναι το *H. pylori* και με μερικούς ιούς. Τα Th2 υπερισχύουν ύστερα από μόλυνση με παράσιτα, όπως τα γαστρεντερικά νηματώδη. Οι αποκρίσεις των T κυττάρων βασίζονται στο προφίλ των εκκρινόμενων κυτταροκινών.

Τα Th1 παράγουν IFN- $\gamma$ , IL-2 και TNF, τα οποία ενεργοποιούν τα μακροφάγα και είναι υπεύθυνα για την κύτταρο-μεσολαβητική ανοσία και την απόκριση φαγοκυττάρωσης. Αντίθετα, τα Th2 παράγουν IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 οι οποίες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή αντισωμάτων, την ενεργοποίηση ηωσινόφιλων και την αναστολή των μακροφάγων, παρέχοντας ανοσιακή απόκριση ανεξάρτητη της φαγοκυττάρωσης. Εκτός από τον προστατευτικό ρόλο, η Th1 ανοσιακή απόκριση ευθύνεται για διαφορετικές ανοσοπαθολογικές αντιδράσεις. Τα κύτταρα της Th1 εμπλέκονται σε οργανο-ειδικές αυτοάνοσες διαταραχές, όπως για παράδειγμα στο πεπτικό έλκος που προκαλείται έπειτα από λοίμωξη με το ελικοβακτήριο του πυλωρού [82].

Τα B κύτταρα συνεισφέρουν στην ανοσοπαθογένεση της λοίμωξης, καθώς παράγουν ειδικά αντισώματα ειδικά για τα αντιγόνα για το *H. pylori* [83]. Χυμική ανοσολογική απάντηση έχει προκληθεί σε όλους σχεδόν τους ασθενείς μολυσμένους από *H. pylori*. Τόσο οι τοπικές όσο και οι συστηματικές αποκρίσεις με αντισώματα περιλαμβάνουν τους ισότυπους IgA, IgG και IgM [79]. Ένας σημαντικός αμυντικός μηχανισμός είναι τα αντισώματα IgA που απωθούν τα παθογόνα και τις μικροβιακές τοξίνες τους από την επιφάνεια του βλεννογόνου. Αναγνωρίζει ειδικά αντιγόνα με τρόπους εξουδετέρωσης υψηλής συγγένειας ώστε να εξουδετερώσει το ελικοβακτήριο του πυλωρού. Η απόκριση IgA προκαλείται από την παρουσία συμβιωτικών μικροβίων στο έντερο. Τα IgM αντισώματα παρουσιάζονται μετά από τέσσερις εβδομάδες από την μόλυνση. Αντισώματα που εκκρίνουν κύτταρα τα οποία παράγουν ειδικά αντισώματα IgA και IgM ενάντια στο ελικοβακτήριο του πυλωρού, ανιχνεύονται στον γαστρικό βλεννογόνο των μολυσμένων με *H. pylori* και εκκριτικά αντισώματα IgA ανιχνεύονται στο γαστρικό χυμό, κάτι που υποδεικνύει πως η λοίμωξη από το *H. pylori* προκαλεί τοπική εκκριτική IgA απόκριση στο στόμαχο. Τα αντισώματα IgA, IgG κατευθύνονται προς πολλά διαφορετικά αντιγόνα του *H. pylori*. Τα περισσότερα άτομα που έχουν μολυνθεί από *H. pylori* αναπτύσσουν συστηματική απόκριση IgG ενάντια του. Η IgG ανιχνεύσιμη (στον ορό) απόκριση, κατευθύνεται έναντι των συμβιωτικών μικροβίων. Ο νεογενικός υποδοχέας Fc μεταφέρει την IgG σε γαστρική έκκριση. Η συστηματική αντί *H. pylori* IgG απάντηση μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση στο γαστρικό βλεννογόνο και να ασκήσει κάποιες αντιβακτηριακές και προφλεγμονώδεις δραστηριότητες [31],[84].

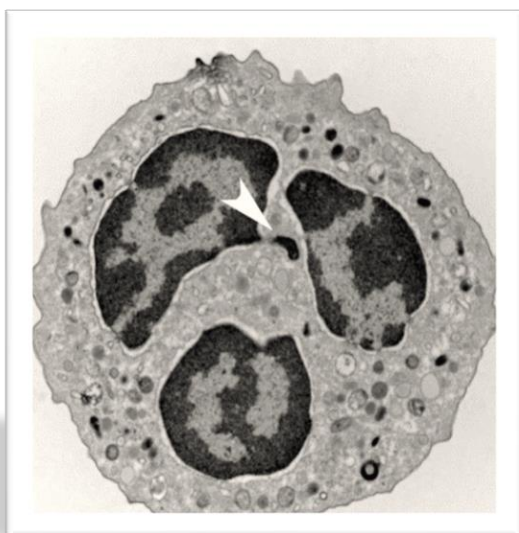
Συμπερασματικά, η λοίμωξη με *H. pylori* οδηγεί στην παρουσία χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας που χαρακτηρίζεται από ενεργές (ουδετεροφιλικές) και χρόνιες (λεμφοκυτταρικές) μορφές. Το γεγονός ότι το ελικοβακτήριο του πυλωρού παραμένει στο στόμαχο σε υψηλή πυκνότητα παρά την ανοσοαπόκριση του ξενιστή υποδεικνύει πως η ανοσολογική απάντηση δεν είναι αποτελεσματική ενάντια του. Επιπλέον, η παρουσία φλεγμονής για πολλά χρόνια υποστηρίζει την υπόθεση πως η ανοσολογική απάντηση απορρυθμίζεται από την παρουσία του *H. pylori* [79]. Το *H. pylori*

χρησιμοποιεί διάφορες στρατηγικές για να ανοσοδιαφύγει. Αμύνεται έναντι του οξειδωτικού στρες με την έκφραση του υπεροξειδίου της δισμουτάσης και της καταλάσης που αποτοξινώνουν το υπεροξείδιο του ανιόντος και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιεί την αργινάση ώστε να αυξήσει την επιβίωση του καθώς με αυτήν αναστέλλει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υπεροξυνιτρώδες σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λιπιδική υπεροξειδωση, βλάβες στο DNA και κυτταρική καταστροφή. Η βακτηριακή αργινάση αυξάνει τον ανταγωνισμό με το υπόστρωμα iNOS στα μακροφάγα, παράγει ουρία μέσω L-αργινίνης, η οποία χρησιμοποιείται από την ουρεάση για την σύνθεση αμμωνίας ώστε να αλκαλοποιήσει το pH του υδροχλωρικού οξέος. Η μείωση του NO από τα μακροφάγα διευκολύνει την διαφυγή των βακτηρίων [83]. Όσο για την φαγοκυττάρωση, έχει φανεί πως το *H. pylori* αναστέλλει την συγκεκριμένη διαδικασία άμυνας [85] που προέρχεται από τα μακροφάγα. Η ουρεάση παρεμβαίνει στην κινητοποίηση των μακροφάγων και ρυθμίζει την φαγοκυττάρωση λόγω της ικανότητας του ενζύμου να επιβραδύνει την οψωνοποίηση [83]. Η επιθηλιακή προσκόλληση του *H. pylori* μπορεί να το ευνοεί γιατί του παρέχει καλύτερη πρόσβαση σε ιστούς πλούσιους με θρεπτικά συστατικά καθώς και να εκκρίνει τις τοξίνες του τις οποίες μεταφέρει στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω του T4SS. Ωστόσο η πολύ σφιχτή και στενή προσκόλληση μπορεί και να το βλάψει όταν έρχεται σε επαφή με τις ανθεκτικές αποκρίσεις του ξενιστή. Επομένως, η επίμονη παραμονή του στον βλεννογόνο εξαρτάται από τον τρόπο προσκόλλησης του *H. pylori* στον βλεννογόνο καθώς και από τη συνεχή προσαρμογή των ιδιοτήτων σύνδεσής του ώστε να ταιριάζει λειτουργικά με τις μετατοπίσεις στα μοτίβα γλυκοσυλίωσης του ξενιστή κατά την διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής. Οι μηχανισμοί ταχείας προσαρμογής αποδίδονται στην ραγδαία μεταβολή της έκφρασης του *SabA* και στα γεγονότα ανασυνδυασμού των γονιδίων *babA* και *babB*. Αφού εδραιωθεί στο γαστρικό επιθήλιο, εισέρχεται στο γαστρικό βλεννογόνο μέσω των στεγανών συνδέσεων των κυττάρων, με αποτέλεσμα να αναδιοργανώνει τον κυτταρικό σκελετό και να αλλάζει την μορφολογία των επιθηλιακών κυττάρων. Μέσα στον γαστρικό ιστό, ακολουθεί διάφορες οδούς, όπως για παράδειγμα να προσκολληθεί μέσω της *SabA* στα ουδετερόφιλα που έχουν καταφτάσει στον γαστρικό βλεννογόνο ή να εισβάλει ενδοκυττάρια σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα είτε είναι φυσιολογικά είτε καρκινικά είτε μεταπλαστικά ή δυσπλαστικά [80].



## 2.2 Ουδετερόφιλα Κύτταρα

Στα τέλη του 19ου αιώνα (1880) ο Paul Ehrlich εξέτασε τους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων και ανακάλυψε νέα είδη μεταξύ των οποίων και τα ουδετερόφιλα. Τους απέδωσε αυτό το όνομα από την ιδιότητα τους να κρατούν ουδέτερο χρώμα στις βασικές και όξινες χρώσεις που χρησιμοποίησε. Ανακάλυψε επίσης πως χαρακτηρίζονται από πολυμορφικό πυρήνα. Ο Elie Metchnikoff (1893) διατύπωσε την θεωρία πως αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν σε τραυματισμένες περιοχές και συμμετέχουν στην πέψη των μικροβίων. Ο χαρακτηριστικός πυρήνας τους τον ενέπνευσε να τα ονομάσει πολυπορφοπύρηνα. Ο πυρήνας τους είναι χωρισμένος σε τρεις έως πέντε συνδεδεμένους λοβούς (Εικόνα 12) [86]. Το βασικό χαρακτηριστικό των κοκκιοκυττάρων που βρίσκονται στα βασεόφιλα, ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα είναι τα κοκκία, αποθέματα πρωτεϊνών που μπορούν να σκοτώνουν τα μικρόβια. Η μετάβαση από τον μυελοβλάστη στα προμυελοκύτταρα σηματοδοτεί τον σχηματισμό κοκκίων που αναπτύσσονται κατά την ωρίμαση των ουδετερόφιλων. Το κυτταρόπλασμα τους περιέχει τρεις τύπους κοκκίων τα πρωτογενή ή αζουροφιλικά, τα δευτερογενή ή ειδικά και τα τριτογενή κοκκία ή κόκκοι ζελατινάσης [87]. Οι αζουροφιλικοί κόκκοι, γνωστοί και ως θετικοί κόκκοι υπεροξειδάσης είναι οι μεγαλύτεροι με διάμετρο 0,3  $\mu\text{M}$  και οι πρώτοι κόκκοι που σχηματίζονται κατά την ωρίμαση των ουδετερόφιλων. Το όνομα τους προέρχεται από την ικανότητα τους να απορροφούν το βασικό αζύριο χρωστικής Α και γεμίζουν με ένζυμα και μικροβιοκτόνες ουσίες, όπως μυελοϋπεροξιδάση (MPO), που αποτελεί κρίσιμο ένζυμο για την οξειδωτική έκρηξη, πρωτεΐνη που αυξάνει την βακτηριογόνο διαπερατότητα, λυσοζύμη και πρωτάσες σερίνης, όπως καθεψίνη G και ουδετεροφιλικές ελαστάσες (NE). Αυτά τα κοκκία απαρτίζουν σχεδόν το 1/3 των συνολικών κοκκίων. Η δεύτερη κατηγορία, τα ειδικά κοκκία είναι μικρότερα, διαμέτρου 0,1  $\mu\text{M}$ , σχηματίζονται μετά τα αζουροφιλικά και δεν περιέχουν MPO αλλά την γλυκοπρωτεΐνη λακτοφερίνη, λυσοζύμη και άλλες αντιμικροβιακές ενώσεις. Η τρίτη κατηγορία κόκκων είναι ακόμα μικρότερη σε μέγεθος, MPO αρνητική, σχηματίζεται τελευταία κατά την ωρίμανση των ουδετερόφιλων, περιέχουν λίγες αντιμικροβιακές ενώσεις και χρησιμεύουν ως χώρος αποθήκευσης μεταλλοπρωτεασών [86].

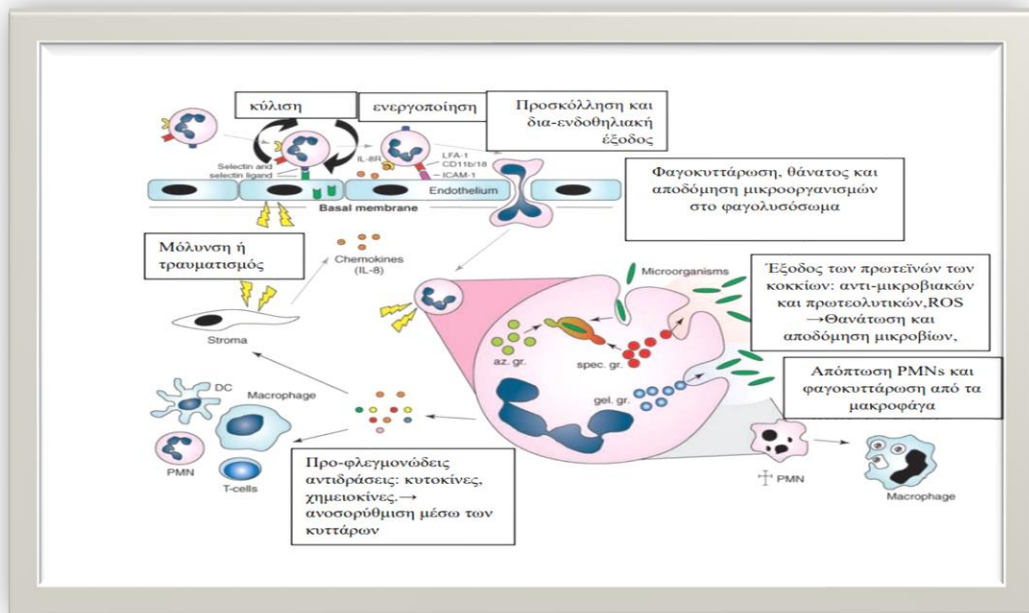


Εικόνα 12. Μορφολογία του Ουδετερόφιλου σε TEM- ηλεκτρονική μικροσκοπία. Προσαρμογή από Brinkmann et al., 2012 [88].

Τα ουδετερόφιλα είναι ο πλέον άφθονος πληθυσμός κυττάρων των κυκλοφορούντων λευκών αιμοσφαιρίων και ο κύριος τύπος κυττάρων στις οξείες φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Κυκλοφορούν ως σφαιρικά κύτταρα, έχουν διάμετρο 12-15  $\mu\text{m}$  και διαθέτουν πολλές μεμβρανώδεις προεξοχές. Παράγονται στον μυελό των οστών από πρόγονα κύτταρα. Ένας ενήλικος άνθρωπος παράγει περισσότερα από  $1-2 \times 10^{11}$  ουδετερόφιλα ημερησίως, τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα για λίγες ώρες ή μέρες. Όταν είναι σε αδρανή μορφή στην κυκλοφορία του αίματος, το σχήμα του είναι σφαιρικό και ζουν 5,4 ημέρες εντός του οργανισμού. Όταν ενεργοποιηθούν εισέρχονται στον ιστό που έχει υποστεί τοπικό τραυματισμό ή μόλυνση, αλλάζουν σχήμα, λειτουργούν για μία έως δύο ημέρες και μετά πεθαίνουν [87]. Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα που εξαγγειώνονται και μεταναστεύουν στα σημεία της λοίμωξης, μετά την είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών στον ξενιστή. Θεωρούνται ισχυρά φλεγμονώδη κύτταρα που προκαλούν φλεγμονώδεις βλάβες στους ιστούς κατά την παραμονή τους [89]. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια της λοίμωξης με *H. pylori*, τα πρώτα κύτταρα τα οποία στρατολογούνται είναι τα ουδετερόφιλα, διεισδύοντας στο χόριο του βλεννογόνου, αποτελούν σήμα κατατεθέν της *H. pylori* λοίμωξης, προκαλώντας τοπική διήθηση και φλεγμονή [90]. Φέρουν στην επιφάνεια τους, όλους τους υποδοχείς Toll (TLR) εκτός από τον TLR3. Μέσω του TLR2 αναγνωρίζονται οι πεπτιδογλυκάνες και τα λιποπεπτίδια που βρίσκονται στην επιφάνεια των gram-θετικών βακτηρίων, μέσω του TLR4 οι λιπολυσακχαρίτες (LPS) των κατά gram-αρνητικών βακτηρίων και μέσω του TLR5 οι φλαγγελίνη [86]. Επίσης, κατά την τοπική φλεγμονώδη απόκριση, τα ουδετερόφιλα, απελευθερώνουν διάφορους μεσολαβητές φλεγμονής προειδοποιώντας

άλλα ανοσοκύτταρα της φυσικής ανοσίας, όπως τα μακροφάγα, για την εισβολή των παθογόνων και έτσι τα ενεργοποιούν, ώστε να αλληλοεπιδρούν για να τα εξουδετερώσουν [89].

Για να μεταναστεύσουν τα ουδετερόφιλα στους ιστούς με φλεγμονή ή στα περιφερικά λεμφογενή όργανα, θα πρέπει να προσκολληθούν και να διαπεράσουν τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων. Η εξαγγείωση περιλαμβάνει τέσσερα στάδια. Την κύλιση που διαμεσολαβείται από σελεκτίνες, την ενεργοποίηση, την καθήλωση ή προσκόλληση και την δια-ενδοθηλιακή έξοδο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM) ειδικά για τα λευκοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν γρηγορότερα από τα μονοκύτταρα, επειδή μπορούν να συνδεθούν με την γρήγορα εκφραζόμενη P-σελεκτίνη και με τα χαμηλά επίπεδα του ICAM-1 που εκφράζεται συνεχώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, τα μονοκύτταρα συνδέονται με την E-σελεκτίνη, το ICAM-1 και με υψηλότερα επίπεδα VCAM, τα οποία εκφράζονται με καθυστέρηση στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων [86]. Τα ουδετερόφιλα είναι σημαντικά κύτταρα της φυσικής ανοσίας που προστατεύουν τον ξενιστή με συγκεκριμένους μηχανισμούς άμυνας, ενάντια στα παθογόνα που εισβάλλουν [89], με την αποκκοκίωση (degranulation), την φαγοκυττάρωση που θεωρείται η κύρια λειτουργία τους, την παραγωγή των Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (ROS) και με την απελευθέρωση των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης (Neutrophils Extracellular Traps-NETs) γνωστή ως διαδικασία νέτωσης (NETosis) [86], (Εικόνα 13) .



Εικόνα 13. Αναπαράσταση της έμφυτης ανοσολογικής άμυνας των ουδετερόφιλων. Προσαρμογή από Borregaard N., 2010 [87].

Η σύνδεση των PRRs των ουδετερόφιλων με τα μόρια των παθογόνων μικροοργανισμών ενεργοποιούν οδούς σηματοδότησης που παρατείνουν την επιβίωση των κυττάρων, διευκολύνουν την προσκόλληση τους και την φαγοκυττάρωση, ενισχύουν την απελευθέρωση των κυτταροκινών, των χημειοκινών, των ROS και προωθούν την αποδόμηση. Η φαγοκυττάρωση προωθείται μέσω της οψωνοποίησης με πρωτεΐνες όπως τα αντισώματα και το συμπλήρωμα. Τα ειδικά αντισώματα αναγνωρίζουν τους επιτόπους στην επιφάνεια των παθογόνων και προωθείται η εναπόθεση των συστατικών του συμπληρώματος μέσω της κλασικής οδού ενεργοποίησης του. Αντισώματα που είναι δεσμευμένα στην επιφάνεια των μικροβίων αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των ουδετερόφιλων, ειδικά για την Fc-περιοχή αντισώματος, συμπεριλαμβανομένου του CD64 (υποδοχέας IgG), CD32 (υποδοχέας IgG χαμηλής συγγένειας), CD16 (υποδοχέας IgG χαμηλής συγγένειας), CD89 (υποδοχέας IgA) και CD23 (υποδοχέας IgE). Για την οψωνοποίηση, τα παθογόνα αναγνωρίζονται από τους επιφανειακούς υποδοχείς των ουδετερόφιλων, όπως τους υποδοχείς C1q, σύνδεση που προκαλεί μεταβολές στον κυτταροσκελετό και οδηγεί στην διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Ο πολυμερισμός των ινιδίων ακτίνης, κοντά στην περιοχή σύνδεσης με τον υποδοχέα διευκολύνει την ροή της μεμβράνης του πλάσματος γύρω από την επιφάνεια που βρίσκονται τα παθογόνα μέχρι να ολοκληρωθεί η εγκόλπωση τους. Έτσι τα εγκλωβισμένα παθογόνα απομονώνονται μέσα στα κενοτόπια, που ονομάζονται φαγοσώματα. Η αντιμικροβιακή ιδιότητα των ουδετερόφιλων στηρίζεται στην παραγωγή υπεροξειδίων και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου και από τους κόκκους που περιέχουν ένζυμα αποικοδόμησης και αντιμικροβιακά πεπτίδια και πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων οδηγεί στην διαδικασία της αναπνευστικής έκρηξης που προκαλείται από απότομη αύξηση του Οξυγόνου. Μετατοπίζονται κυτταροπλασματικά συστατικά στην μεμβράνη του πλάσματος ή του φαγοσώματος και συντίθεται NADPH. Η οξειδάση με αναγωγή ηλεκτρονίων από το κυτταροπλασματικό NADPH στο ενδοφαγοσωμικό μοριακό Οξυγόνο, σχηματίζει υπεροξειδίο του ανιόντος, το οποίο είναι βραχύβιο και παράγει γρήγορα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (υπεροξειδίο του υδρογόνου) και άλλα δευτερογενή αντιδραστικά προϊόντα, όπως το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (μονήρες οξυγόνο), τα οποία είναι αποτελεσματικές μικροβιοκτόνες ενώσεις αλλά αποτελούν τοξικά μόρια, καθόσον προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Η ταυτόχρονη ένωση NADPH- οξειδάσης της φαγοκυττάρωσης προκαλεί την αποκκοκίωση, η οποία περιλαμβάνει σύντηξη των κυτταροπλασματικών κοκκίων με την μεμβράνη του πλάσματος και του φαγοσώματος. Οι αρνητικοί κόκκοι υπεροξειδάσης, (δευτερογενείς και οι ειδικοί κόκκοι), χρησιμεύουν ως δεξαμενή λειτουργικά σημαντικών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι θετικοί κόκκοι στην υπεροξειδάση (αζουροφιλικό κόκκοι) συντήκονται με τα φαγοσώματα, εμπλουτίζεται το κενό του αυλού με αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα, λυσοζύμη και της βακτηριοκτόνου πρωτεΐνης και αυξάνεται η αντιμικροβιακή

διαπερατότητα. Η αντιμικροβιακή δράση των ουδετερόφιλων αποτελείται από ROS και ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών πεπτιδίων και ενζύμων. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες δεν κάνουν διάκριση μεταξύ ξενιστή και παθογόνου και δεδομένου ότι τα ουδετερόφιλα περιέχουν ένζυμα που καταστρέφουν τους ιστούς του ξενιστή (ελαστάση, ζελατινάση και κολλαγονάση) όπως και η υπερπαραγωγή ROS προκαλεί οξειδωτικό stress, θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός για τον περιορισμό της βλάβης στα κύτταρα και τους ιστούς του ξενιστή κατά τη διάρκεια και μετά τη φλεγμονώδη αντίδραση. Προκειμένου λοιπόν να υποχωρήσει η φλεγμονή, θα πρέπει να επέλθει η ομοιόσταση του οργανισμού, κάτι που συμβαίνει με την απόπτωση των γερασμένων ουδετερόφιλων. Έτσι διατηρείται ο καθορισμένος αριθμός κυττάρων στην κυκλοφορία και επιλύεται η οξεία φλεγμονώδης απόκριση. Τα αποπτωτικά ουδετερόφιλα αναγνωρίζονται και απομακρύνονται από τα μακροφάγα (efferocytosis) και η διαδικασία καθορίζεται από προ- και άντι- αποπτωτικά σήματα [91].

## 2.3 Εξωκυττάρια Δίκτυα Ινιδίων Χρωματίνης (NETs)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένας μηχανισμός άμυνας των ουδετερόφιλων είναι η απελευθέρωση των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης (NETs). Το 1996, ο Takei και συν. παρατήρησαν για πρώτη φορά έναν μοναδικό τύπο θανάτου των ουδετερόφιλων, ύστερα από την χρήση PMA. Εμφανίστηκαν μορφολογικές αλλαγές με την έκλυση χρωματίνης από το σπασμένο πυρηνικό περίβλημα και την κυτταρική μεμβράνη [92]. Σε συνέχεια αυτών των ευρημάτων, οι Brinkmann και συν. [93] το 2004, απέδειξαν πως τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν την χρωματίνη του πυρήνα τους, σχηματίζοντας εξωκυττάρια ίνες ή δίκτυα που μοιάζουν με δίχτυα, γνωστές ως ουδετεροφιλικές εξωκυττάρια παγίδες (Neutrophil Extracellular Traps, NETs), δομές που αποτελούνται από κόκκους και συστατικά του πυρήνα, ικανές να εγκολλώνουν και να θανατώνουν τα βακτήρια εξωκυττάρια. Τα NETs παράγονται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα. Η υπερδομή τους είναι ασυνήθιστη και ξεχωριστή. Αποτελούνται από πολύ εύθραυστες, λεπτές ίνες διαμέτρου 15-17 nm και σφαιρικές δομές 25nm που συγκεντρώνονται σε μεγαλύτερα νημάτια διαμέτρου 50 nm. Η σύνθεση τους μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό και βρέθηκε ότι αποτελούνται από αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη και πρωτεΐνες των αζουροφιλικών κοκκίων, όπως ουδετεροφιλική ελαστάση (NE), μυελοϋπεροξειδάση (MPO), καθεψίνη G και των δευτερογενών κοκκίων όπως η λακτοφερίνη και η ζελατινάση. Ταυτόχρονα ταυτοποιήθηκε η παρουσία συμπλέγματος ιστονών H2A-H2B-DNA. Οι ίδιοι παρατήρησαν την εμφάνιση των NETs σε λοίμωξη βακτηρίων τόσο gram-αρνητικών αλλά και gram-θετικών. Άλλα ευρήματα ήταν ότι η παρουσία LPS και IL-8 που παρατείνουν την ζωή των ουδετερόφιλων, μπορούν να προκαλούν NETs και επίσης πως τα NETs σχηματίζονται δέκα λεπτά μετά την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων που σαν διαδικασία προηγείται της απόπτωσης [93]. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα απελευθερώνουν NETs. Έχει δειχθεί πως τα ζώα, τα φυτά και οι μονοκύτταροι ευκαρυώτες χρησιμοποιούν την χρωματίνη στην ανοσία τους. Αυτές οι εξωκυττάρια δομές είναι απαραίτητες για την άμυνα του ξενιστή κατά την φυσική ανοσία [94]. Η απελευθέρωση των NETs συμβαίνει μέσω μιας διαδικασίας κυτταρικού θανάτου, της νέτωσης (NETosis). Όμως το κυτταρικό φαινόμενο απελευθέρωσης πυρηνικού ή μιτοχονδριακού DNA έχει παρατηρηθεί και από βιώσιμα ουδετερόφιλα. Επειδή λοιπόν θεωρείται ότι και τα νεκρά (νετωτικά) και τα βιώσιμα ουδετερόφιλα παράγουν NETs, είναι πιο ορθό να χρησιμοποιείται ο όρος «σχηματισμός των NETs» ("NETS formation") αντί για NETosis για να καλυφθεί το φαινόμενο εξαγωγής DNA από όλα τα είδη ουδετερόφιλων με ή χωρίς κυτταρικό θάνατο [95].

Ο σχηματισμός των NETs *in vitro*, οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο των ουδετερόφιλων αλλά *in vivo* αναφέρεται πως παραμένουν ενεργά και λειτουργικά, υποδεικνύοντας πως ο σχηματισμός των NETs μπορεί να μην είναι το τελικό συμβάν απαραίτητα [96]. Τέλος, εξαιτίας της ετερογένειας των

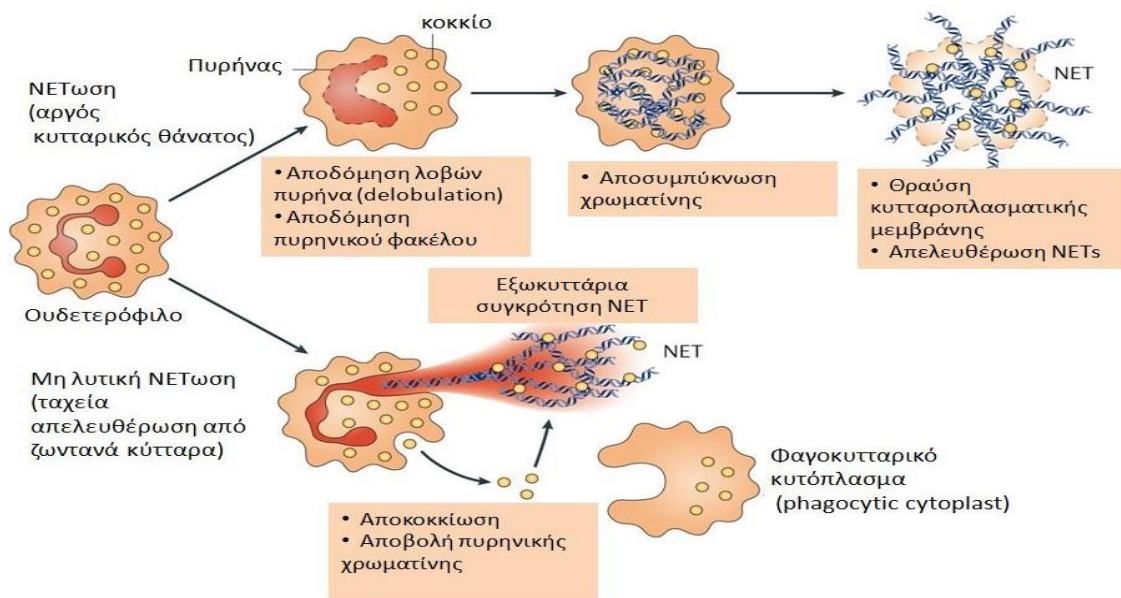
ουδετερόφιλων κατέστη σαφές πως δεν σχηματίζουν όλα τα ουδετερόφιλα NETs, ούτε στον ίδιο βαθμό ή με τον ίδιο ρυθμό, ωστόσο εικάζεται πως τα γερασμένα ουδετερόφιλα ανταποκρίνονται πιο γρήγορα στους μηχανισμούς άμυνας της φαγοκυττάρωσης και του σχηματισμού NETs [94].

Το DNA που βρίσκεται στα NETs προέρχεται ως επί το πλείστον από τον πυρήνα, αλλά περιέχεται επίσης και μιτοχονδριακό DNA. Τα NETs προλαμβάνουν την εξάπλωση των βακτηρίων και των μυκήτων και εξουδετερώνουν ιούς, βακτήρια, μύκητες και παράσιτα, ενώ παράλληλα απελευθερώνονται και ως απάντηση στις εκκρινόμενες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ουσιαστικά εγκολλώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς με την βοήθεια των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων που περιέχονται στα ινίδια τους, για αυτό αναφέρεται πως τα NETs έχουν αντιμικροβιακή ιδιότητα. Αρχικά, ταυτοποιήθηκαν 24 πρωτεΐνες στα NETs, αλλά έχει αποδειχθεί πως η σύνθεση των NETs διαφέρει ανάλογα με το παθογόνο που έχει να αντιμετωπίσει το ουδετερόφιλο, αφού συνήθως απαρτίζονται από 33-50 πρωτεΐνες και βιοδραστικά συστατικά, από τον πυρήνα, την κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα. Στην δομή των NETs, μαζί με αυτά που περιέγραψαν αρχικά οι Brinkmann και συν., περιλαμβάνονται και πολλά άλλα αντιμικροβιακά πεπτιδία και πρωτεΐνες όπως MMP9, IL-37, TF [97]. Τα περισσότερα από αυτά προέρχονται από τους κόκκους, λιγότερα από τον πυρήνα και ελάχιστα από το κυτταρόπλασμα [88]. Τελικά, τα NETs ενδεχομένως σκοτώνουν τα παθογόνα με δύο τρόπους. Είτε συγκεντρώνουν το αντιμικροβιακό φορτίο τους στο τόπο της λοίμωξης, είτε εμποδίζουν την εξάπλωση των μικροβίων πέρα από το αρχικό σημείο της μόλυνσης [98]. Τα NETs έχουν εμπλακεί σε πολλές λοιμώδεις ασθένειες, όχι μόνο αντιμικροβιακής φύσης αλλά και σε αυτοάνοσα νοσήματα, στον HIV, στον καρκίνο ακόμα και στον COVID-19 [95]. Ωστόσο, τα παθογόνα έχουν κάποιους τρόπους άμυνας έναντι των NETs. Τα παθογόνα καλύπτουν τον εαυτό τους με ένα καψίδιο και έτσι μπορούν, είτε να αναστείλουν τον σχηματισμό των NETs, είτε να γλιτώσουν από την θανάτωση τους, ή τέλος να εκκρίνουν ενδονουκλεάσες, οι οποίες είναι ικανές να κόβουν και να αποδεκατίζουν τα NETs [97]. Αυτές οι αποδομημένες μορφές των δικτύων χρωματίνης συναντώνται με τον όρο "degraded NETs". Αξίζει να σημειωθεί πως το *H. pylori* αποδομεί τα NETs.

Δεκαοχτώ χρόνια μετά, έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες και μελέτες σχετικά με την δομή, τους μοριακούς μηχανισμούς, τον τρόπο δράσης και μηχανισμών των NETs καθώς και την εμπλοκή τους σε διάφορες ασθένειες. Ωστόσο ακόμα παραμένουν πολλά θέματα να αποσαφηνιστούν και να μελετηθούν.

### 2.3.1 Μονοπάτια σηματοδότησης των NETs

Διαφορετικές οδοί μπορούν να παράγουν NETs με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 14). Ο μηχανισμός σχηματισμού των NETs ως άμυνα του ξενιστή, απαιτεί έναν καταρράκτη διαδικασιών που ξεκινά από την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Όταν ενεργοποιηθούν, αλλάζουν το σχήμα τους, αποπολώνονται αναστέλλοντας την δυναμική της ακτίνης τους και ξεκινούν κάποιες συγκεκριμένες διεργασίες ώστε να μπορέσουν να σχηματιστούν οι εξωκυττάρια παγίδες. Στη συνέχεια, αποδομείται ο πυρηνικός φάκελος, από-συμπυκνώνεται η πυρηνική χρωματίνη στο κυτταρόπλασμα και αναμιγνύεται με τα συστατικά που απελευθερώνουν οι κόκκοι και το κυτταρόπλασμα. Έπειτα, σταθεροποιείται η μεμβράνη του πλάσματος και τα NETs εξαπλώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, 3-8 ώρες μετά την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Ένα εναλλακτικό μηχανισμό, αποτελεί η μη λυτική νέτωση που ξεκινά με την αναγνώριση λιποπολυσακχαριτών των βακτηρίων από τα ουδετερόφιλα και οδηγεί σε ταχεία και απευθείας απελευθέρωση των NETs, σε μόλις λίγα λεπτά, όπως συμβαίνει πχ., έναντι της μόλυνσης από *Staphylococcus aureus* [97].



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας ουδετεροφιλικού δικτύου χρωματίνης (NET), μέσω δύο μονοπατιών. Το πρώτο αφορά το μονοπάτι κυτταρικού θανάτου (NETωση) και το δεύτερο σε μη λυτική NETωση. Προσαρμογή: Παπαγιαννοπουλος V., 2018 [97].

Από μοριακή άποψη, τα λίγα γεγονότα που έχουν αποδειχθεί ότι απαιτούνται για την δημιουργία των NETs, είναι η παραγωγή ROS, η μετανάστευση της NE και αργότερα της MPO από τους κόκκους στον πυρήνα, η επεξεργασία των ιστονών και τελικά η ρήξη του κυττάρου [88]. Για να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση της χρωματίνης, αρχικά ενεργοποιείται από το μονοπάτι παραγωγής ROS. Τα ROS και κατ' επέκταση και το οξειδωτικό στρες, παράγονται από την NADPH οξειδάση, η οποία αποτελεί βασική προϋπόθεση για τον σχηματισμό των NETs. Σε αυτό το μονοπάτι, δύο



ένζυμα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, η MPO και η NE. Οι δραστικές ρίζες διεγείρουν την MPO να μετατοπίσει την NE από τους αζουροφιλικούς κόκκους προς τον πυρήνα, η NE έρχεται σε επαφή με τις ιστόνες και διαταράσσει την από-συμπύκνωση των ιστονών και αυτές δεσμεύονται από την MPO. Ωστόσο έχει αποδειχθεί πως αναστολή της MPO δεν εμποδίζει την νέτωση, αλλά την καθυστερεί. Αυτή η οξειδωτική ενεργοποίηση είναι σημαντική, γιατί η NE ενώνεται με τα νημάτια της F-ακτίνης στο κυτταρόπλασμα και πρέπει να τα διασπάσει ώστε να εισέλθει στον πυρήνα. Η δράση της NE για διάρρηξη και από-συμπύκνωση του πυρήνα είναι γνωστή *in vitro*, χωρίς όμως να αποκλείονται και άλλοι μηχανισμοί που συνεργούν στην διαδικασία, χωρίς όμως να έχουν αποσαφηνιστεί [99]. Το σύμπλεγμα ενζύμων οξειδάσης NADPH, γνωστό και ως φαγοκυτταρικής οξειδάσης PHOX συγκεντρώνεται στην κυτταρική και κυταροπλασματική μεμβράνη και μειώνει το μοριακό οξυγόνο σε ανιόντα υπεροξειδίου με την μεταφορά ηλεκτρονίων. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) μεταβάλλεται σε υπεροξειδίου του υδρογόνου, που ενεργεί ως υπόστρωμα για το πιο άφθονο ένζυμο στους κόκκους των ουδετερόφιλων, το MPO. Το MPO αντιδρά με το υπεροξειδίου του υδρογόνου και δημιουργεί το υποχλωριώδες οξύ (HOCL). Οι ROS οξειδώνουν διάφορους τύπους μορίων, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊνικών οξέων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών [100].

Το μονοπάτι MPO-NE ενεργοποιείται από πολλά παθογόνα μεταξύ των οποίων και κρυστάλλους και σε ασθενείς με χρόνια κοκκιωματώδη νόσο (CGD) [97]. Η απαίτηση των ROS για την δημιουργία NETs έχει αποδειχθεί με τον έλεγχο ουδετερόφιλων σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια. Ασθενείς με μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε υπομονάδα του συμπλέγματος PHOX δεν μπορούν να παράγουν ROS, ούτε να σχηματίσουν NETs. Οι ασθενείς με CGD πάσχουν από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, απειλητικές για την ζωή. Προκειμένου να μπορέσουν να παράξουν NETs, τους χορηγείται θεραπεία ουδετερόφιλων με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [88]. Μια άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύει την πυρηνική χρωματίνη είναι η DEK. Έλλειψη της DEK εξασθενεί το φαινόμενο της NETosis ενώ η εξωγενής χορήγησή της ανασυνδυνασμένης πρωτεΐνης DEK προάγει την από-συμπύκνωση της χρωματίνης, υποδηλώνοντας παρόμοια δράση με την MPO [101]. Επιπλέον, είναι γνωστό πως τα ROS προκαλούν αυτοφαγία καθώς, ένας αριθμός κινασών και υποδοχέων, όπως πχ. οι PI3K κινάσες φωσφοϊνοσιτιδής-3 που επάγονται από τα ROS, έχουν συνδεθεί με την νέτωση, ως αντίδραση στο PMA, σε μικροοργανισμούς και παράσιτα. Η παρουσία της PI3K στην νέτωση σχετίζεται με την αυτοφαγία. Τα προμυελοκύτταρα που δεν διαθέτουν την σχετιζόμενη με αυτοφαγία πρωτεΐνη ATG7, παρουσιάζουν μείωση στην δημιουργία NETs. Ο mTOR καταστέλλει την αυτοφαγία, έχει όμως επίσης αναφερθεί στην απελευθέρωση NETs. Παράλληλα, έχουν παρατηρηθεί LC3B θετικές δομές κενοτοπίων, που μοιάζουν με αυτό-φαγώματα σε ουδετερόφιλα που υποβάλλονται σε νέτωση. Η αυτοφαγία που επάγεται από τα ROS, απαιτείται για την διατήρηση της έκρηξης τους και μπορεί

επίσης να βοηθήσει στην ανοχή του οξειδωτικού στρες. Κατά την διάρκεια της νέτωσης η διαπερατότητα της μεμβράνης του πλάσματος συμβαίνει με ένα φυσικό τρόπο και όχι από την εξαγωγή της χρωματίνης. Αυτή η διαπίστωση αποδεικνύει πως η νέτωση είναι ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και έτσι προκαλείται νεκρόπτωση [97].

Η ιστόνη 3 παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών και συγκεκριμένα της citH3 εμπλέκεται στον σχηματισμό των NETs *in vitro* και συνδέεται με το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cf-DNA), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης απελευθέρωσης των NETs σε έναν ιστό, αλλά και ως πιθανός προληπτικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της σήψης [98]. Κατά τον σχηματισμό των NETs, απαιτείται από-συμπύκνωση της χρωματίνης για την εξώθηση της από τον πυρηνικό φάκελο που έχει διαρρηχθεί. Η χρωματίνη είναι σφιχτά συσκευασμένη μέσα στον πυρήνα και για να μπορέσει να εξωθηθεί θα πρέπει πρώτα να από-συμπυκνωθεί ή να διαλυθεί. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιείται το ένζυμο PAD-4, η οποία μετατρέπει τη θετικά φορτισμένη αργινίνη σε κιτρουλλίνη, οδηγώντας σε απώλεια των θετικών φορτίων των ιστονών, καταλύοντας τη μετατροπή καταλοίπων αργινίνης σε κιτρουλλίνη και άρα σε διακοπή της σύνδεσης της με το DNA [102]. Η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών για την από-συμπύκνωση της χρωματίνης απουσία NE δεν είναι σαφής. Ίσως η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών δεν είναι επαρκής για την απο-συμπύκνωση της χρωματίνης. Ωστόσο αναστολείς της NE μπλοκάρουν την απο-συμπύκνωση της χρωματίνης, κατά την διάρκεια πνευμονικής μυκητιασικής λοίμωξης χωρίς να παρεμβάλλεται η citH3, υποδεικνύοντας πως η κιτρουλλινοποίηση συμβαίνει ανεξάρτητα [94]. Το PAD-4 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα ουδετερόφιλα, ωστόσο ο ρόλος του PAD-4 στον σχηματισμό των NETs παραμένει αμφιλεγόμενος και χρήζει περαιτέρω μελέτης. Αναστολή του ενζύμου σε ποντίκια έδειξαν πως η αναστολή του PAD-4 μειώνει τον σχηματισμό των NETs και ανεπάρκεια του, οδηγεί σε πιο κατεστραμμένες ή ασταθείς μορφές "αποδομημένων-degraded" NETs [103]. Άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ουδετερόφιλα κύτταρα ποντικών, έδειξαν πως η αναστολή του PAD-4 εμποδίζει την απελευθέρωση NETs σε καταστάσεις σηψαιμίας και καρκίνου και η ανεπάρκεια του οδηγεί σε αποτυχία της δημιουργίας των NETs, έπειτα από προσβολή των ουδετερόφιλων με LPS ή TF [97].

### 2.3.2 Ρύθμιση των NETs

Η παραγωγή των ROS σταματάει όταν απελευθερωθούν τα NETs. Όμως, στην χρόνια φλεγμονή και στην περίπτωση που τα μακροφάγα δεν μπορούν να φαγοκυτταρώσουν τα ουδετερόφιλα, η παραμονή των NETs προκαλεί ιστικές βλάβες και τελικά αποδεικνύεται επιζήμια για τον ξενιστή [102].

Διαφορετικά ερεθίσματα (PMA, ιονομικίνη, οι διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί) που δεσμεύουν το ένζυμο PAD επάγουν την δημιουργία NETs με ποικίλους τρόπους και το πρότυπο των κιτρουλλινοποιημένων υποστρωμάτων μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό των σχετικών ανοσοπαθολογικών μηχανισμών *in vivo*. Για αυτόν τον λόγο, η δημιουργία των NETs πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά για να αποφεύγεται η παθολογία των ιστών. Ένας παράγοντας που παίζει ρόλο στην ρύθμιση των NETs είναι το μέγεθος των μικροοργανισμών. Τα NETs σχηματίζονται κατά προτίμηση, εναντίον μικροοργανισμών μεγάλου μεγέθους, ενώ τα μικρότερα παθογόνα απορροφώνται στα φαγοσώματα που συγχωνεύονται με αζουροφιλικούς κόκκους, απομονώνοντας την NE από τον πυρήνα και εμποδίζοντας την από-συμπύκνωση της χρωματίνης. Ωστόσο η απελευθέρωση των NETs έχει αναφερθεί και έπειτα από λοίμωξη με μικρά βακτήρια [97]. Τα NETs μπορούν να σκοτώσουν τα επιθηλιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η υπερβολική παραμονή τους βλάπτει το επιθήλιο ειδικά στον πνεύμονα. Επίσης συνδέονται με ηπατική βλάβη κατά την διάρκεια σήψης [104], προκαλούν ίνωση λόγω της παρουσίας του PAD-4 και είναι παρόντα σε ασθενείς με κυστική ίνωση [105] και τέλος μπορούν να προκαλούν απόφραξη των αγγείων και θρόμβωση [96].

### 2.3.3 Τα NETs σε άλλες ασθένειες

Από το 2004, που οι Brinkman και συν., ανακάλυψαν τα ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης ως έναν αμυντικό μηχανισμό της έμφυτης ανοσίας, πραγματοποιήθηκαν πολλές έρευνες με σκοπό την ταυτοποίηση, αλλά και την μελέτη της δραστηριότητας των NETs σε διάφορες ασθένειες.

Τα NETs έχουν εμφανιστεί σε πολλές ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα, έπειτα από συστημακή λοίμωξη με *Staphylococcus aureus*, μια από τις πιο κοινές, σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις παγκοσμίως, οι μελέτες δείχνουν ταχεία απελευθέρωση των NETs, μέσα σε λίγα λεπτά από την έκθεση στο βακτήριο, μέσω μη λυτικής νέτωσης. Αυτή η ταχεία ανοσιακή απάντηση δημιουργίας NETs πραγματοποιείται από τα πρώτα ουδετερόφιλα κύτταρα που φτάνουν στο σημείο της φλεγμονής, όπως έχουν δείξει μελέτες που πραγματοποιήθηκαν και στον άνθρωπο και σε ποντίκια [104], [106].

Το 2006, οι Urban και συν., ταυτοποίησαν για πρώτη φορά την ύπαρξη των NETs, ύστερα από μόλυνση με τον μύκητα *Candida albicans*, κυρίαρχο αιτιολογικό παράγοντα των μυκητιάσεων στον άνθρωπο, ένα ευκαρυωτικό παθογόνο που προκαλεί καντιτίαση και προσβάλλει διάφορα μέρη του σώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το *C. albicans* στις διάφορες μορφές του είναι ευαίσθητο στην θανάτωση από τα NETs [107].

Το 2010, οι Gabriel και συν., έδειξαν την ύπαρξη των NETs στο παράσιτο *Leishmania donovani*. Τα ουδετερόφιλα μέσω των TLRs υποδοχέων (TLR2, TLR4) αναγνωρίζουν το παράσιτο, προκαλώντας ταχεία απελευθέρωση των NETs ανεξάρτητη της δημιουργίας των ROS. Τα αποτελέσματα τους υποδεικνύουν πως τα NETs μπορούν να συμβάλλουν στον περιορισμό του παρασίτου στο σημείο ενοφθαλμισμού διευκολύνοντας έτσι την πρόληψη τους από τα ουδετερόφιλα [108].

Το 2012, οι Saitoh και συν., έδειξαν την διαμεσολάβηση των NETs στην αμυντική απόκριση του ξενιστή στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV- Human Immunodeficiency Virus). Έδειξαν πως τα ουδετερόφιλα μέσω των TLRs υποδοχέων (TLR7, TLR8) αναγνωρίζουν τον ιό, παράγονται ROS που οδηγούν στον σχηματισμό των NETs και αυτά με την σειρά τους μπορούν να εγκολπώσουν τον ιό και να εμπλακούν στην αποβολή του, μέσω της MPO και της α-δεφενσίνης (α-defensin). Με αυτό τον τρόπο δείχθηκε ανοσιακή απάντηση των NETs έναντι των ιών, ωστόσο όμως ο ιός HIV φαίνεται ικανός να εξουδετερώνει αυτόν τον μηχανισμό άμυνας [109].

Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και για την ταυτοποίηση των NETs στα μεταβολικά νοσήματα. Το 2015 οι Wong και συν., έδειξαν πως ο διαβήτης (τύπου I και II) υποβάλλει τα ουδετερόφιλα σε νέτωση, μέσω της οποίας εμποδίζεται σοβαρά η επούλωση των πληγών. Επίσης, οι Tall και Westertep, το 2019 μελέτησαν σε ανθρώπους και ποντίκια την συσχέτιση φλεγμονής και χοληστερόλης στην αθηροσκλήρωση, που αποτελεί την συνηθέστερη μορφή αρτηριοσκλήρωσης, η οποία χαρακτηρίζεται από εναποθέσεις χοληστερόλης, λιπιδίων και ασβεστίου στα τοιχώματα των αρτηριών. Η συσσώρευση της χοληστερόλης ενεργοποιεί την φλεγμονή και ενεργοποιούνται μεταξύ άλλων τα ουδετερόφιλα τα οποία σχηματίζουν NETs. Μάλιστα, στον άνθρωπο η δημιουργία φλεγμονοσώματος και η ενεργοποίηση των NETs, ίσως συμβάλλουν στην αθηροσκληρωτική διάβρωση και θρόμβωση κυρίως σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, με νεφρική ανεπάρκεια ή με κλωνική αιματοποίηση [110].

Ο ρόλος των NETs έχει μελετηθεί και σε αυτοάνοσα νοσήματα. Όπως για παράδειγμα το 2016, οι Gupta και Kaplan, διερεύνησαν τον σχηματισμό των NETs σε άτομα με γενετική προδιάθεση ανάπτυξης αυτοάνοσων νοσημάτων. Τα πειραματικά στοιχεία που συλλέχθηκαν, υπέδειξαν τον

σημαντικό ρόλο στην παθογένεια από αποτυχία σε αυτοανοχή λόγω μεγάλης ποικιλίας αυτοαντιγόνων. Πολλά αυτοαντιγόνα που εξωτερικεύονται μέσω του σχηματισμού των NETs μάλλον συμβάλλουν στην έναρξη και διαίونيση της ανοσοανεπάρκειας και της σύνθεσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Τα NETs που δημιουργούνται δεν έρχονται σε μία ισορροπία με αυτά που αποδομούνται. Έτσι, τα NETs παραμένουν σχηματισμένα και απελευθερωμένα στα σημεία, ενισχύεται η επαφή τους με τροποποιημένα αυτοαντιγόνα και αυξάνεται η πρόκληση βλάβης των διαφόρων ιστών [111]. Παραδείγματα αυτάνοσων νοσημάτων που έχει μελετηθεί η ύπαρξη και ο ρόλος των NETs είναι η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος (ΣΕΛ). Η ψωρίαση είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από δερματική υπερπλασία και διήθηση των ουδετερόφιλων στο δέρμα. Τα ουδετερόφιλα εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης, συνδέοντας την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία και ενεργώντας ως κύρια πηγή της IL-17, η οποία προκαλεί υπερπλασία των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας. Η εξωτερίκευσή της σε βιοενεργή μορφή είναι εφικτή μέσω σχηματισμού των NETs, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και στην πανγκρεατίτιδα [112]. Ομοίως βρέθηκε πως ο μη φυσιολογικός σχηματισμός των NETs αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Η μείωση του σχηματισμού των NETs με αναστολή απαμινασών της πεπτιδυλ-αργίνινης, που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια, εξασθένησε την κλινική δραστηριότητα της νόσου και φαίνεται να αποτρέπει την καταστροφή των αρθρώσεων [113]. Ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος είναι ένα αυτοάνοσο που χαρακτηρίζεται από παραγωγή αυτοαντισωμάτων τα οποία προκαλούν τραυματισμούς των ιστών. Η εμπλοκή των NETs στην παθοφυσιολογία της νόσου έχει αποδειχθεί. Η νέτωση στον ΣΕΛ σχετίζεται με αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης REDD1, ως απάντηση στο στρες. Τα δεδομένα υποδεικνύουν την συμμετοχή των NETs στην αυτοφαγία και στην ζημιά και την ίνωση που προκαλείται στους ιστούς. Η επαγόμενη από αυτοφαγία αποδέσμευση των NETs που φέρουν TF και IL-17 συνδέει την θρομβοφλεγμονή και την ίνωση στον ΣΕΛ [114].

Ο ρόλος των NETs μελετήθηκε και στον οικογενή μεσογειακό πυρετό (ΟΜΠ) το 2016, από τους Apostolidou και συν.. Πρόκειται για ένα γενετικά κληρονομούμενο νόσημα που εμφανίζεται σε άτομα που προέρχονται από την Μεσόγειο. Η φλεγμονή που εμφανίζεται στον ΟΜΠ χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό ουδετερόφιλων που κυκλοφορούν και εισέρχονται στις προσβεβλημένες περιοχές. Η έναρξη της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης ξεκινάει με απελευθέρωση NETs που γεμάτα με IL-1β. από την άλλη η πρόληψη της κρίσης διαμεσολαβείται από την αυτοφαγία [115].

Το 2013 οι Cheng και Palaniyar αποκάλυψαν πως τα NETs έχουν ευεργετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες αλλά ασκούν και δυσμενείς επιδράσεις και σε πνευμονικές νόσους και στην ίνωση. Έχει

αποδειχθεί πως παίζουν κρίσιμο ρόλο και προκαλούν βλάβες των ιστών. Αρκετές φλεγμονώδεις παθήσεις των πνευμόνων χαρακτηρίζονται από την μετανάστευση και διήθηση των ουδετερόφιλων στον αυλό των αεραγωγών και στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. Τα NETs έχουν συσχετιστεί με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, με άσθμα, με κυστική ίνωση, με οξεία πνευμονική βλάβη και το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας [116].

Τα πρώτα στοιχεία παρατήρησης NETs που παίζουν ρόλο στον ανθρώπινο καρκίνο, δημοσιεύτηκαν για πρώτη φορά το 2013 και βασίστηκαν σε έναν μικρό αριθμό δειγμάτων από το σάρκωμα Ewing, έναν σπάνιο όγκο που εμφανίζεται περισσότερο συχνά σε εφήβους από ότι σε ενήλικες [117]. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τους καρκινικούς όγκους με την διήθηση των ουδετερόφιλων με αυξημένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μετανάστευση και κακή πρόγνωση. Αρκετές άλλες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να διευρυνθεί η παρουσία και ο ρόλος των NETs στον καρκίνο. Μεταξύ άλλων οι Erpenbeck και Schön το 2017 λαμβάνοντας υπόψιν την εμπλοκή των NETs στην παθογένεια των φλεγμονωδών και κακοήθων νόσων, την εξέλιξη των όγκων, τη μετάσταση και τη θρόμβωση προσπάθησαν να προσεγγίζουν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το φαινόμενο υφίσταται στην καρκινογένεση και να προτείνουν πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους για τους ασθενείς [118]. Το 2016, οι Arelaki και συν., απέδειξαν για πρώτη φορά την παρουσία των NETs στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και συγκεκριμένα στο κόλον. Τα NETs περιείχαν TF και βρέθηκαν τόσο στην πρωτογενή εστία όσο και στην μεταναστευτική μάζα [119].

Επιπλέον, NETs έχουν παρατηρηθεί σε ασθένειες του στοματικού βλεννογόνου, όπως στην περιοδοντίτιδα. Οι γλυκάνες στο σάλιο επάγουν NETs μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει ROS ή NE. Αυτά τα NETs είναι πιο ανθεκτικά στις νουκλεάσες και σκοτώνουν τους μικροοργανισμούς πιο αποτελεσματικά από τα NETs που παράγονται με το PMA [120].

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που προέρχονται από κλινικές και εργαστηριακές μελέτες ότι τα NETs είναι σημαντικοί παράγοντες στην φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση. Μεγάλης σημασίας είναι η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα, δεδομένου πως αποδείχθηκε ότι οι στεφανιαίοι θρόμβοι είναι αποτέλεσμα κυρίως αυτής της αλληλεπίδρασης. Η ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας εμφανίζεται από μια σειρά γεγονότων που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των NETs, οδηγώντας στον σχηματισμό θρόμβου και απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων. Η έκφραση του TF στα NETs ενεργοποιεί περαιτέρω το σύστημα πήξης και οδηγεί σε επέκταση θρόμβου [121].

Τέλος, με την εμφάνιση της πανδημίας του κορωνοϊού το 2019, οι Skendros και συν., διερεύνησαν τη δημιουργία NETs και την πιθανή συσχέτιση τους στην πορεία της λοίμωξης των ασθενών από τον ιό. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το συμπλήρωμα και τα ουδετερόφιλα τροφοδοτούν την υπερφλεγμονή και τη θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την αλληλεπίδραση του άξονα θρομβίνης, με τα αιμοπετάλια τα οποία κολλούν επάνω στα ουδετερόφιλα, με το συμπλήρωμα. Τα ουδετερόφιλα εκφράζουν υψηλά ποσοστά TF και τα NETs φέρουν ενεργό TF και η συνεργασία συμπληρώματος με τα NETs στην ανοσοθρόμβωση της νόσου COVID-19 [122].

### 3. Σκοπός της εργασίας

Σε προηγούμενες εργαστηριακές παρατηρήσεις του εργαστηρίου, ταυτοποιήθηκε η παρουσία των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης στον γαστρικό βλεννογόνο, σε *H. pylori*-θετικούς ασθενείς με χρόνια ενεργό γαστρίτιδα, ύστερα από εξέταση δειγμάτων γαστρικού βιοπτικού υλικού. Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη των αντιμικροβιακών μηχανισμών των ουδετερόφιλων κυττάρων, δηλαδή τη φαγοκυττάρωση, τη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και τον σχηματισμό και τη δραστηριότητα των NETs κατά τη μόλυνση με στελέχη του *H. pylori*. Για αυτόν τον σκοπό απομονώθηκαν ανθρώπινα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος από υγιείς δότες και συγκαλλιεργήθηκαν σε σύστημα πειραματικής λοίμωξης με *H. pylori* ισογενή μεταλλάγματα του στελέχους αναφοράς P12 που εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό EPIYA επαναλήψεων (ABCC, ABCCC), το αντίστοιχο μεταλλαγμένο  $\Delta$ CagA, στο οποίο έχει διαγραφεί το γονίδιο *cagA* και ένα πρόσφατα απομονωμένο *H. pylori* κλινικό στέλεχος. Τα ουδετερόφιλα μέσω του μηχανισμού άμυνας των NETs, έχουν μελετηθεί σε άλλες λοιμώξεις και μη ασθένειες καθώς και σε αυτοάνοσα νοσήματα ενώ δεν έχουν μελετηθεί καθόλου στην λοίμωξη από το *H. pylori*. Γι' αυτό τον λόγο, εξετάζεται στην παρούσα εργασία, η δράση των NETs στην λοίμωξη από *H. pylori*.



## **Β. Πειραματικό Μέρος/ Μεθοδολογία**

## **4. Υλικά και Μέθοδοι**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής του τμήματος Ανοσολογίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του τμήματος Μικροβιολογίας στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Η αιμοληψία πραγματοποιούταν στο κτήριο αιμοληψίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ).

### **4.1 Χειρισμός βακτηριακών στελεχών *H. pylori***

#### **4.1.1 Καλλιέργεια στελεχών *H. pylori***

Τα στελέχη του βακτηρίου *H. pylori* καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία CHA με στερεό θρεπτικό υλικό Columbia Blood Agar Base (CBA- Oxoid). Τα τρυβλία περιείχαν 7% αίμα αλόγου και 1% Vitox (Oxoid) και τα αντιβιοτικά: 10μg/ml βανκομυκίνη, 10μg/ml τριμεθοπρίμη, 104 IU/liter πολυμυξίνη Β, 2μg/ml αμφοτερικίνη Β, 10μg/ml ναλιδιξικό οξύ, 30μg/ml βακιτρακίνη, 5μg/ml φλουοροκυτοσίνη (Sigma). Τα τρυβλία φυλάσσονταν στους 4°C, μέχρι την χρησιμοποίησή τους. Για την καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιείτο ενοφθαλμισμός 150 μl διαλύματος βακτηρίου που είχε αποψυχθεί λίγα λεπτά πριν από τους -80°C, υπό πάγο, σε θάλαμο νηματικής ροής και με την χρήση αποστειρωμένων γυάλινων πιπετών Pasteur. Στην συνέχεια οι βακτηριακές καλλιέργειες τοποθετούνταν σε επωαστικά δοχεία, παρουσία καταλύτη και ειδικών φακέλων (Campygen, Oxoid) δημιουργίας μικροαερόφιλων συνθηκών (90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 48 ώρες.

#### **4.1.2 Κρύο-συντήρηση στελεχών *H. pylori***

Τα βακτηριακά στελέχη φυλάσσονταν κατεψυγμένα σε αμπούλες κρύο-συντήρησης (cryovials) στους -80°C. Το σύνολο της βιομάζας ενός τρυβλίου ανεπτυγμένης και μακροσκοπικά διακριτής καλλιέργειας *H. pylori* επαναιωρείτο μέσα σε 1,8 ml Brain Heart Infusion Broth (BHIB) με 20% γλυκερόλη σε αμπούλες κρύο-συντήρησης.

#### **4.1.3 Στελέχη *H. pylori* που χρησιμοποιήθηκαν**

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν κρύο-συντηρημένα και κατασκευασμένα από προηγούμενες εργαστηριακές μελέτες [123]. Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αναφοράς HpP12, το οποίο διαθέτει CagA με συνδυασμό EPIYA-

ABCC μοτίβων και το ισογενές μετάλλαγμα του, που διαθέτει τρία διαδοχικά αντίγραφα της κωδικής αλληλουχίας EPIYA-C (HpP12-CCC ή *H. pylori* 3C). Επιπλέον παράχθηκε και το αντίστοιχο στέλεχος  $\Delta$ CagA (knock out), με διακοπή της αλληλουχίας του γονιδίου *cagA*, μετά από εισαγωγή κασέτας αντοχής χλωραμφενικόλης και ένα κλινικό στέλεχος (Hp981) που είχε πρόσφατα απομονωθεί από θετική στην *H. pylori* λοίμωξη γαστρική βιοψία.

#### **4.1.4 Απομόνωση γενωμικού DNA στελέχους Hp981 από στερεή καλλιέργεια**

Προκειμένου να μελετηθούν τα EPIYA-C μοτίβα στο γονιδίωμα του κλινικού στελέχους απομονώθηκε DNA για ανάλυση με PCR. Για την απομόνωσή του γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit DNeasy Blood and Tissue της εταιρίας QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκε μικρή ποσότητα βακτηριακής βιομάζας και επαναιωρήθηκε σε 500μl PBS. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση 5000xg για 10 λεπτά. Κατόπιν αφαίρεσης του υπερκείμενου, το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 180μl Buffer ATL, με διαδοχική προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 56°C για 1-3 ώρες, μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Προστέθηκαν 120μl Buffer AL και ταυτόχρονα 200μl απόλυτης αιθανόλης (96-100%). Ο συνολικός όγκος του δείγματος μεταφερόταν σε στήλες DNeasy Mini spin όπου έγινε φυγοκέντρηση στα 6000xg για 1', ούτως ώστε το DNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολούθησε πλύση του DNA με 500μl διαλύματος Buffer AW1 και φυγοκέντρηση στα 6000xg για 1' και πλύσεις με 500μl διαλύματος Buffer AW2 και φυγοκέντρηση στα 20.000xg για 3' και προσθήκη 100μl Buffer AE, επώαση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση 6000xg για 1', για την έκλυση του DNA.

#### **4.1.5 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τον προσδιορισμό του αριθμού των EPIYA-C επαναλήψεων στην πρωτεΐνη CagA**

Εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR για τον πολλαπλασιασμό της σχετικής περιοχής του γονιδίου *cagA*, με σκοπό τον προσδιορισμό των EPIYA-C μοτίβων, που έχει αναπτυχθεί από το Εργ. Ιατρικής Μικροβιολογίας [124].

Συνοπτικά, η αντίδραση της PCR περιείχε 10mM Tris, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 1U Taq, 200uM DNTPs, 0.5uM primers και 5ul DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο *cagA*2530S με αλληλουχία: GTT AAR AAT RGT GTR AAY GG, όπου R=A ή G, Y=T ή C και ο *cagA*3000AS με αλληλουχία: TTT AGC TTC TGA TAC CGC. Χρησιμοποιήθηκε ο

κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της Eppendorf. Οι συνθήκες τελικού πολλαπλασιασμού του επιθυμητού τμήματος, ήταν διαδοχικά 35 κύκλοι αποδιάταξης των 30 sec στους 94°C, ειδικού υβριδισμού των 45 sec στους 50°C, επιμήκυνσης των 45 sec στους 72°C με μια τελική επιμήκυνση για 7' στους 72°C. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη 1% αγαρόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύθηκαν και φωτογραφήθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία με το σύστημα Gel Doc (Biorad, Hercules, CA, USA).

#### **4.1.6 Σήμανση *H. pylori* με CFDA-SE**

Η σήμανση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Logan *et al.*, [125]. Βακτηριακό εναιώρημα  $10^9$  cfu/ml επώαστηκε με διάλυμα χρωστικής CFDE-SE MB=557,4692 και 5mM (Fluka-Sigma), μετά από πλύση με PBS. Αρχικά, φυγοκεντρήθηκε 1ml RPMI 1640 που περιείχε τα βακτήρια στα 3000xg για 5 λεπτά. Κατόπιν, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στα 3000xg για 5' και αναδιάλυση με PBS. Προστέθηκε η αραιωμένη CFDE-SE και αναδιαλύθηκε το βακτηριακό ίζημα. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20' και δύο διαδοχικές πλύσεις με PBS. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 3000xg για 5' και αναδιάλυση με PBS. Στη συνέχεια, τα βακτήρια καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση στα 3000xg για 5' και επαναιωρήθηκαν σε 1ml RPMI 1640, για την χρήση τους σε πειράματα φαγοκυττάρωσης.

Όλες οι διαδικασίες απομόνωσης, γονοτύπησης, καλλιέργειας και κρυοσυντήρησης των βακτηριακών στελεχών *H. pylori*, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του ΕΠΠ.

#### **4.2. Επικάλυψη καλυπτρίδων με διάλυμα poly-L λυσίνης**

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες, στρογγυλές καλυπτρίδες, διαμέτρου 13 mm πάνω στις οποίες στρώνονταν τα ουδετερόφιλα κύτταρα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μία πλύση των καλυπτρίδων σε ένα γυάλινο τρυβλίο, επικαλύπτοντας με διάλυμα poly-L λυσίνης. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με ενέσιμο ύδωρ (Water For Injection). Οι καλυπτρίδες παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επομένη μέρα, ώστε να στεγνώσουν.

#### **4.3 Απομόνωση Υγιούς Ανθρώπινου Ορού (Healthy Human Serum)**

Ελήφθη αίμα όγκου 10-14 ml και τοποθέτηση του σε ειδικά βιοχημικά μπουκαλάκια αιμοληψίας (BD Vacutainer, SST II Advance) χωρητικότητας 3,5ml που περιείχαν διοξείδιο του πυριτίου επικαλυμμένο μέσω ψεκασμού και ένα πολυμερές πήκτωμα για διαχωρισμό του ορού. Ακολούθησε φυγοκέντρηση με συνθήκες: 1500xg, για 10'. Ο ορός συλλεγόταν σε φιαλίδια Eppendorf και φυλασσόταν στους -80°C. Διαχωριζόταν σε ποσότητες 35-60 μl σε μικρότερα φιαλίδια Eppendorf, ώστε να αποφεύγονται οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης και απόψυξης.

## 4.4 Πειράματα Ανίχνευσης Φαγοκυττάρωσης και Απεικόνισης Εξωκυττάρων Δικτύων Χρωματίνης (NETs)

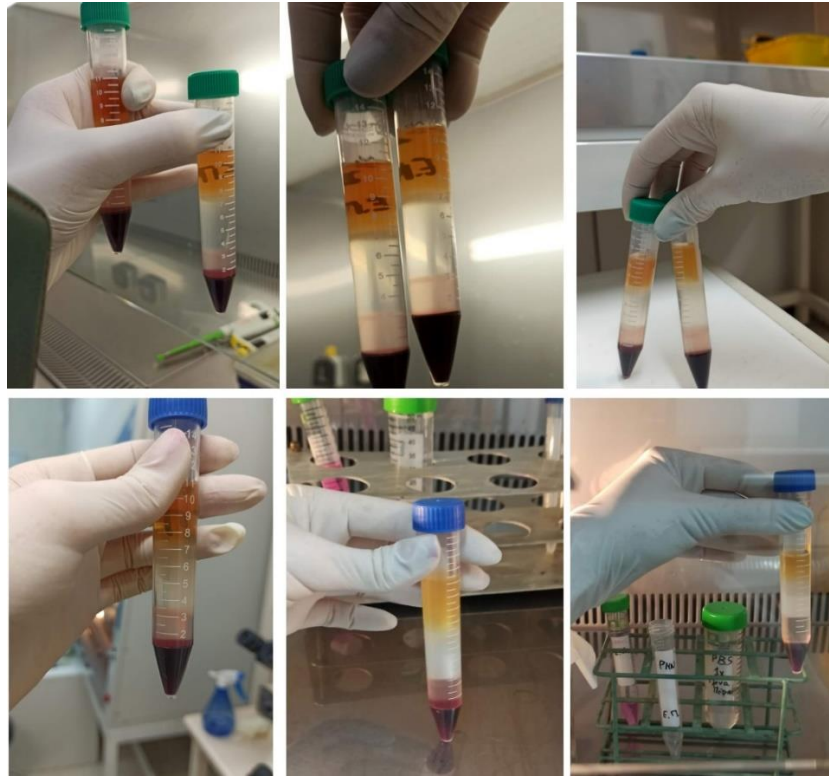
Το πείραμα για την δημιουργία και απεικόνιση των ουδετερόφιλων κυττάρων έπεται από μόλυνση με στελέχη *H. pylori in vitro*, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kambas Κ. και συν., 2012 [126].

### 4.4.1 Απομόνωση Ουδετερόφιλων

Ελήφθησαν 8-14 ml ολικού περιφερικού αίματος, από υγιείς δότες και τοποθετήθηκαν σε ηπαρινισμένα φιαλίδια αιμοληψίας (BD Vacutainer, με ηπαρίνη ψεκασμένη στα τοιχώματα, χωρητικότητας 4 ml) (Εικόνα15α). Ακολούθησε προσθήκη 2 ml PBS 1X και ελαφριά ανακίνηση. Κατόπιν προετοιμάστηκαν σωληνάρια των 15 ml όπου προστίθενται 3 ml φικόλης μεγαλύτερης πυκνότητας 1.119 g/ml (Cat. NO: P04-60150) και επιστοιβάχθηκαν 3 ml φικόλης μικρότερης πυκνότητας 1.077 g/ml (Cat. No: P04-60100) και στη συνέχεια επιστοιβάχθηκε το αίμα και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε συνθήκες 1100xg, για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται διαστρωμάτωση των συστατικών του αίματος, όπως εμφανίζεται στην εικόνα 15β. Κατόπιν απομάκρυνσης των στοιβάδων του πλάσματος και των μονοκυττάρων ακολούθησε συλλογή των ουδετεροφίλων (Εικόνα 15γ). Ακολούθησε έκπλυση με PBS και φυγοκέντρηση σε 300xg, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου, απόρριψη του υπερκειμένου και τα ουδετερόφιλα επαναιωρήθηκαν σε 600 μl RPMI 1640 (Εικόνα 15δ), για τελική χρήση σε πειράματα μόλυνσης με *H. pylori* για ανοσοφθορισμό ή κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα15α. Κατά την αιμοληψία το αίμα τοποθετείται σε ειδικά αντιπηκτικά φιαλίδια.



Εικόνα 15β Διαχωρισμός στοιβάδων αίματος ύστερα από φυγοκέντρηση. Από πάνω προς τα κάτω διακρίνονται: το πλάσμα, η στοιβάδα των μονοκυττάρων, ακολουθεί η 1η στοιβάδα φικόλης, η στοιβάδα που περιέχει τα ουδετερόφιλα που διακρίνονται από ένα ελαφρύ ροζ διάφανο χρώμα. Ακολουθεί η 2η στοιβάδα φικόλης και η στοιβάδα που περιέχει τα ερυθρά αιμοσφαίρια.



Εικόνα 15γ. Πραγματοποιείται διαχωρισμός αίματος μετά την πρώτη φυγοκέντρηση και συλλέγονται τα ουδετερόφιλα από όλα τα δείγματα.



Εικόνα 15δ. Μετά την δεύτερη φυγοκέντρηση μένει το ίζημα με τα ουδετερόφιλα, το οποίο επαναιωρείται με θρεπτικό μέσο RPMI 1640.

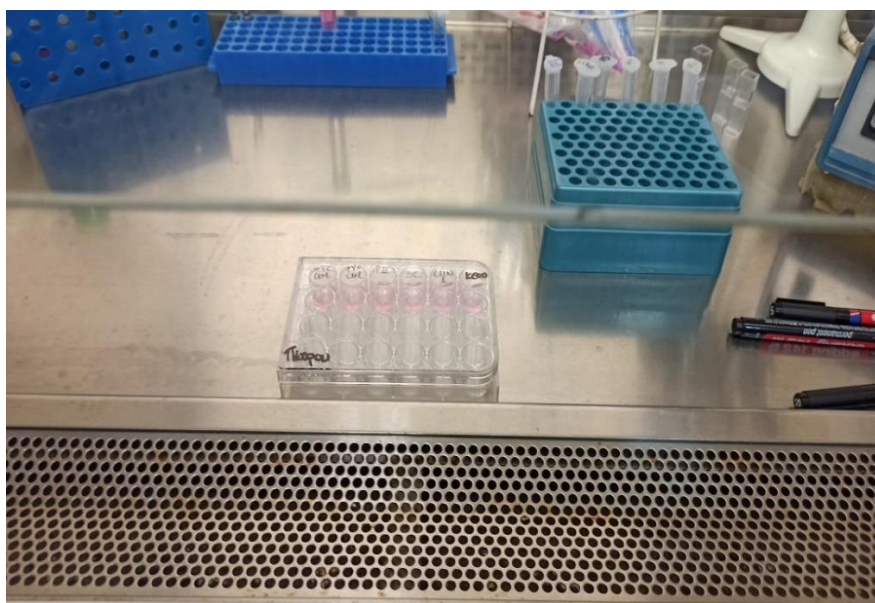
#### 4.4.2 Μόλυνση Ουδετερόφιλων κυττάρων με στελέχη *H. pylori*

Η μόλυνση των ουδετερόφιλων κυττάρων με βακτήρια *H. pylori* πραγματοποιούνταν σε αναλογία βακτηρίων ανά κύτταρο=100, multiplicity of infection, MOI=100), μετά από πειράματα βελτιστοποίησης. Χρησιμοποιούνταν καλλιέργειες βακτηρίων που είχαν πραγματοποιηθεί 48 ώρες πριν. Συλλεγόταν η βακτηριακή βιομάζα από τις στερεές βακτηριακές καλλιέργειες και ακολουθούσε επαναιώρηση τους σε θρεπτικό υλικό RPMI, που προηγουμένως είχε ζεσταθεί στο υδατόλουτρο στους 37°C για 30'. Ακολούθως μετρίοταν η θολερότητα σε μήκος κύματος 600nm και η τελική αραιώση του βακτηρίου ρυθμιζόταν σε μέτρηση 0,740, η οποία αντιστοιχούσε επί τη βάσει προηγούμενων μετρήσεων του εργαστηρίου σε  $10^9$  βακτήρια/ml. Για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης των βακτηρίων προς τα ουδετερόφιλα, λαμβανόταν υπόψιν ότι σε κάθε κυψελίδα στρώνονταν  $10^5$  (100.000) ουδετερόφιλα και απαιτούνταν  $10^7$  βακτήρια για την αναλογία MOI=100. Έτσι προστίθεντο 100μl βακτηριακού εναιωρήματος σε κάθε κυψελίδα ώστε να ικανοποιείται η προαναφερθείσα αναλογία 100 βακτηρίων ανά κύτταρο, κατά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Για τη διαδικασία της οψωνοποίησης, προστίθεντο σε φιαλίδια Eppendorf 10μl από το αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος και 5 μl ορού και ακολούθησε επώασή τους υπό ανάδευση στους 56°C για 90'.



#### 4.4.3 Ανίχνευση φαγοκυττάρωσης και δημιουργίας NETs με ανοσοφθορισμό

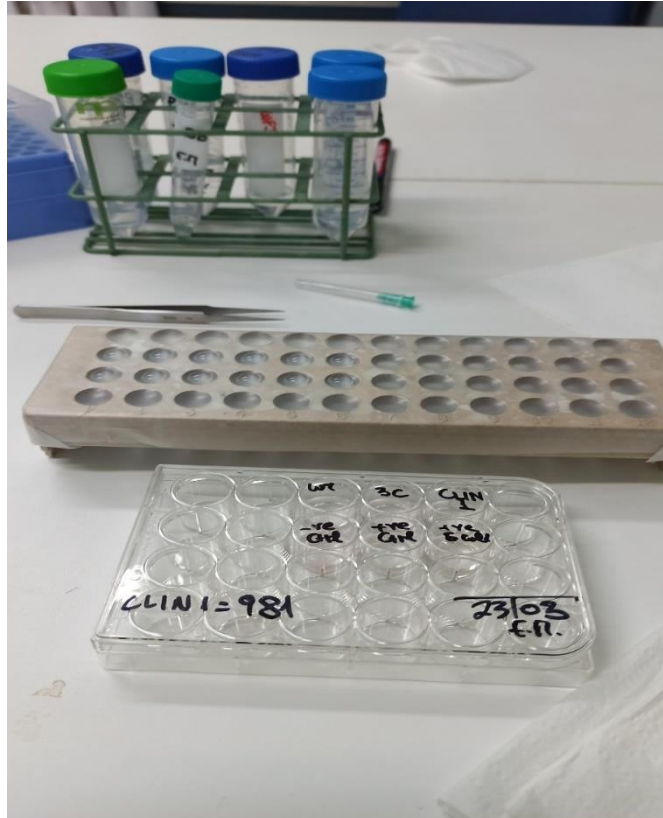
Σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων με 24 κυψελίδες, τοποθετούνταν οι επικαλυμμένες με poly-L λυσίνη καλυπτρίδες που περιείχαν  $10^5$  ουδετερόφιλα, παρουσία 2% ορού σε κάθε κυψελίδα. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιονομυκίνη και λυοφιλοποιημένο, οψωνοποιημένο βακτήριο *E. coli*. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο για 3,5 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με παραφορμαλδεΐδη (PFA) τελικής συγκέντρωσης 4% (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Συγκαλλιέργεια ουδετερόφιλων με τα βακτηριακά στελέχη *H. pylori* και προσθήκη των οψωνοποιημένων μαρτύρων ιονομυκίνης και *E. coli* αντίστοιχα σε πιάτο καλλιέργειας 24 κυψελίδων. Κατόπιν ακολουθούσε επώαση σε κλίβανο για 3,5 ώρες.

Ακολουθούσε ο ανοσοφθορισμός, μέσω του οποίου αναγνωρίζονται συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή αντιγόνα στα κύτταρα. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με 120 μl PBS. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε 0,5% Triton x-100 για 1' και ακολουθούσαν 3 πλύσεις με PBS. Στην συνέχεια οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν σε 5% Blocking Buffer (BB) για 30'. Το Blocking Buffer περιέχει 5% ορό αλόγου (horse serum) σε PBS. Ακολουθούσε η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης μυελούπεροξειδάσης (anti-MPO) (Novus Biologicals, goat) και το αντίσωμα έναντι της κίτρουλλινοποιημένης ιστόνης 3 (anti-CitH3) (Abcam, rabbit) για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραίωση του anti-MPO ήταν 1:150 ενώ της anti-CitH3 1:200. Οι καλυπτρίδες πλένονταν με PBS 3 φορές και ακολούθησε επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα σε αραίωση 1:500 anti-goat (Biotium, με φθοριόχρωμα CF647, φορέα φιλοξενίας: Donkey, δραστηριότητα: goat)

και anti-rabbit (Biotium, με φθοριόχρωμα CF568, φορέα φιλοξενίας: Donkey, δραστηριότητα: rabbit). Ακολουθούσαν 3 πλύσεις με PBS, οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν σε DAPI για 3' και ακολουθούσε μία πλύση με ενέσιμο ύδωρ (Εικόνα 17α). Ύστερα, τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με προστατευτικό διάλυμα Mowiol και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C, όπως φαίνεται στην εικόνα 17β.



Εικόνα 17α. Ανοσοσίμανση με πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα, με σκοπό την παρατήρηση της φαγοκυττάρωσης και του σχηματισμού των NETs στο μικροσκόπιο συνεστίασης.



Εικόνα 17β. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

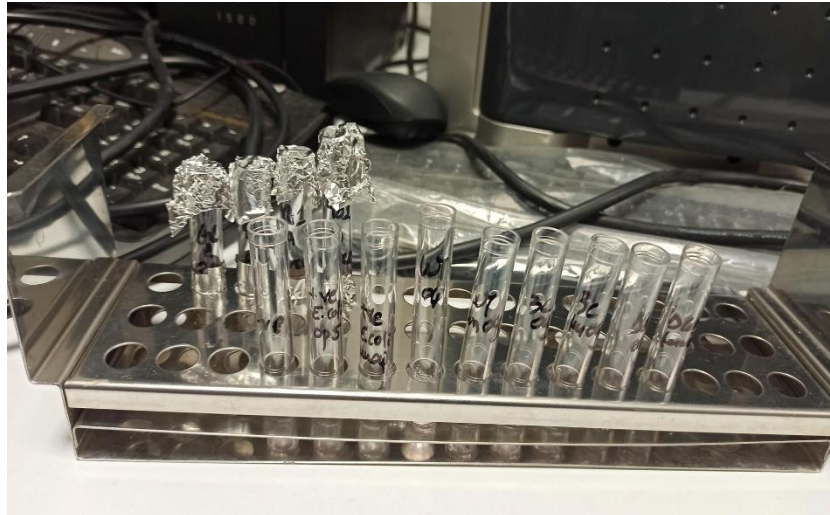
Για πειράματα μελέτης φαγοκυττάρωσης χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη HpP12, HpP12-CCC (*H. pylori* 3C), HpΔCagA, Hp981 και η επώαση με τα ουδετερόφιλα πραγματοποιήθηκε όπως παραπάνω για 90'. Στην συνέχεια, τα δείγματα παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας.

Τα πειράματα απομόνωσης ουδετεροφίλων, ανοσοφθορισμού και απεικόνισης NETs των ουδετεροφίλων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής του ΕΙΠ. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την παρατήρηση της φαγοκυττάρωσης και των NETs, χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό ανάστροφο μικροσκόπιο Leica TCS SP8P, που βρίσκεται στις εγκαταστάσεις της Μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του ΕΙΠ (ΜΟΜ-ΕΙΠ). Οι φακοί που χρησιμοποιήθηκαν στο μικροσκόπιο είναι οι 20x, 40x και 63x. Το πρόγραμμα (software) του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι το LASx (Leica Application Suite x) και η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το ImageJ.

#### **4.5 Προσδιορισμός επιπέδων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS)**

Προκειμένου να μετρηθούν τα επίπεδα επαγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου ως μηχανισμός άμυνας των ουδετεροφίλων, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit FagoFlowEx (Exbio) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η απομόνωση και η μόλυνση των ουδετεροφίλων κυττάρων με βακτήρια *H. pylori* πραγματοποιούνταν σε αναλογία βακτηρίων ανά κύτταρο=100, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Για την παρατήρηση παραγωγής ROS, αρχικά προστίθεντο βακτηριακά στελέχη σε φιαλίδια Eppendorf παρουσία ορού και επωάζονταν υπό ανάδευση στους 56°C για 1,5 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της οψωνοποίησης. Στην συνέχεια τα ουδετερόφιλα επωάζονταν για 20' στους 37°C με τα οψωνοποιημένα και μη οψωνοποιημένα βακτηριακά στελέχη *H. pylori* και με θετικό μάρτυρα το *E. coli*, παρουσία της χρωστικής DHR123. Στη συνέχεια προστίθετο Lysing-fixing Solution σε όλα τα δείγματα και επωάζονταν για 5' σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούσε πλύση. Τέλος, στα δείγματα προστίθεντο 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O, τοποθετούνταν σε ειδικά σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 18) και ακολουθούσε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur (Becton Dickinson), που βρίσκεται σε ειδική εγκατάσταση του ΕΙΠ του εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, αναλύοντας 10<sup>4</sup> κύτταρα ανά δείγμα.



*Εικόνα 18. FACS tubes που περιέχουν ουδετερόφιλα με οψωνοποιημένα και μη οψωνοποιημένα βακτηριακά στελέχη, και τον θετικό μάρτυρα E. coli προς ανάλυση αποτελεσμάτων στον κυτταρομετρητή ροής.*

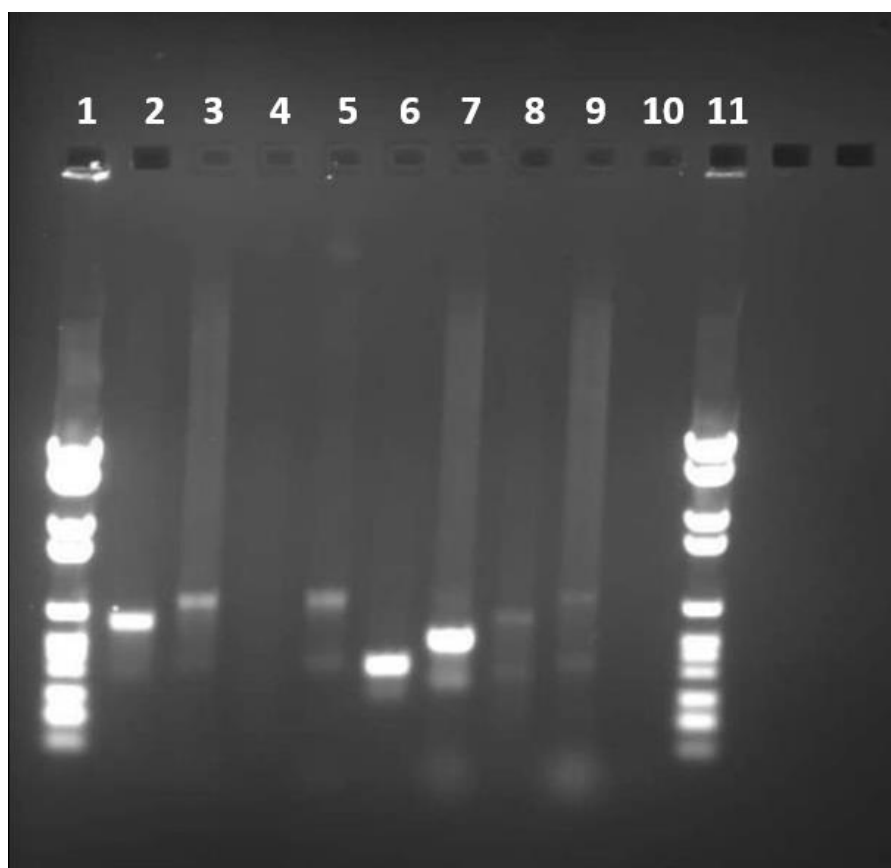
## **5. Στατιστική Ανάλυση**

Στα παραπάνω πειράματα και στα αποτελέσματά τους, ακολουθήθηκε στατιστική ανάλυση, η οποία έγινε με το πρόγραμμα GraphPad. Για την σύγκριση των μέσων όρων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μονοδιάστατη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA). Για σύγκριση κατά ζεύγη των μέσων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bonferroni's multiple comparisons test. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε  $p < 0,05$ .

## Γ. Αποτελέσματα

### 6.1 Υπολογισμός του αριθμού EPIYA-C επαναλήψεων κλινικού στελέχους 981

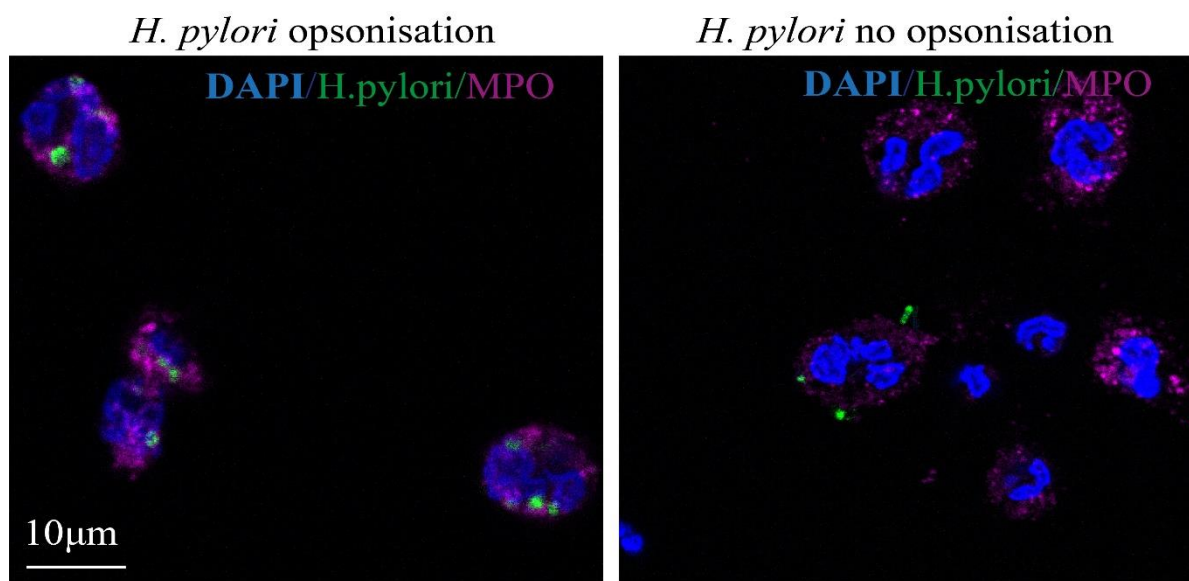
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κλινικού στελέχους Hp981 αναφορικά τον αριθμό EPIYA-C επαναλήψεων με PCR, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 19. Στις στήλες 1 και 11 είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους pBR328. Στην στήλη 2 έχει φορτωθεί το δείγμα του βακτηριακού στελέχους άγριου τύπου HpP12, στην στήλη 3 HpP12-CCC, στην στήλη 4 το HpΔCagA, στην στήλη 5 το Hp981. Στις στήλες 6,7,8,9 έχουν φορτωθεί αντίστοιχα οι τέσσερις θετικοί Μάρτυρες: AB, ABC, ABCC, ABCCC. Τέλος, στην στήλη 10 ο αρνητικός μάρτυρας απουσία DNA. Ανάλυση των μοριακών βαρών σε πήκτωμα αγαρόζης 1% δείχνει ότι το Hp981 δίνει παρόμοιου μοριακού βάρους ζώνη με το εργαστηριακό στέλεχος HpP12-CCC το οποίο διαθέτει τρία διαδοχικές επαναλήψεις της αλληλουχίας EPIYA-C. Άρα, το κλινικό στέλεχος Hp981 που είχε πρόσφατα απομονωθεί από βιοψία ασθενούς, θετικό σε *H. pylori* λοίμωξη, έχει EPIYA-CCC.



Εικόνα 19. Υπολογισμός του αριθμού EPIYA-C επαναλήψεων κλινικού στελέχους 981 (πήκτωμα αγαρόζης 1%).

## 6.2 Τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τα βακτηριακά στελέχη *H. pylori* έπειτα από οψωνοποίηση

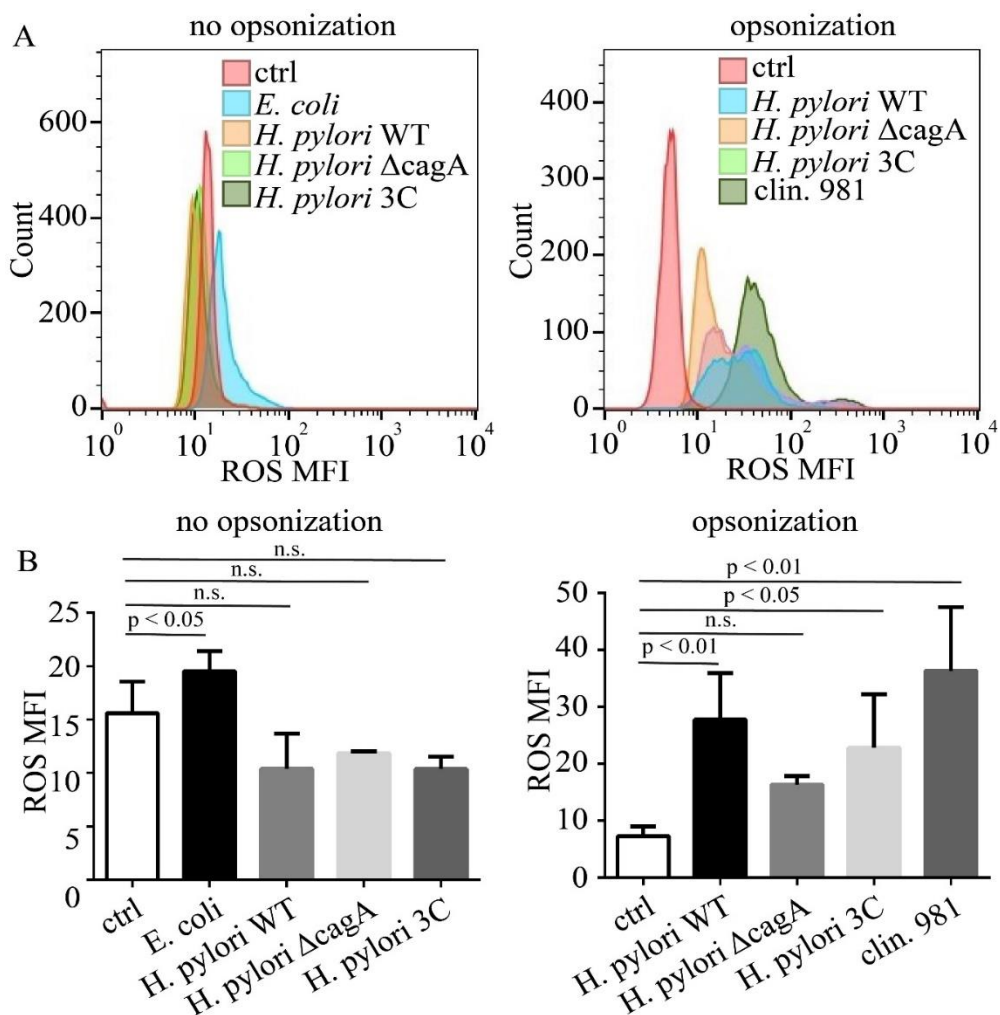
Είναι γνωστό πως κατά την λοίμωξη από το *H. pylori* το γαστρικό επιθήλιο διηθείται από ουδετερόφιλα κύτταρα [90]. Παρόλα αυτά, δεν έχει διερευνηθεί η ανοσολογική απόκριση των ουδετερόφιλων κυττάρων στην λοίμωξη από *H. pylori* σε *in vitro* συνθήκες. Για αυτό τον λόγο αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα των ουδετερόφιλων να φαγοκυτταρώνουν, επειδή όπως προαναφέρθηκε αποτελεί έναν σημαντικό αντιμικροβιακό μηχανισμό των ουδετερόφιλων, ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα ουδετερόφιλα κύτταρα φαγοκυτταρώνουν όλα τα βακτηριακά στελέχη του *H. pylori* και μάλιστα η φαγοκυττάρωση εξαρτάται από την οψωνοποίηση, όπως παρατηρήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία (Εικόνα 20). Τα στελέχη του βακτηρίου τα οποία υποβλήθηκαν σε οψωνοποίηση, φαγοκυτταρώθηκαν από τα ουδετερόφιλα κύτταρα. Αντίθετα, τα ουδετερόφιλα δεν ήταν ικανά να φαγοκυτταρώσουν τα ίδια βακτηριακά στελέχη, απουσία οψωνοποίησης.



**Εικόνα 20. Χαρακτηριστική απεικόνιση φαγοκυττάρωσης *H. pylori* από τα ουδετερόφιλα κύτταρα με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.** Αριστερά, φαίνεται να πραγματοποιείται η φαγοκυττάρωση του ελικοβακτηρίου του πυλωρού από τα ουδετερόφιλα, αφού έχει προηγηθεί οψωνοποίηση. Με μπλε χρώμα φαίνεται ο πυρήνας που έχει χρωστεί με DAPI, με μωβ απεικονίζεται η MPO και με πράσινο χρώμα το βακτήριο αφού προηγουμένως έχει σημανθεί με την χρωστική ουσία CFDA-SE. Η θέση που εντοπίζεται το βακτήριο μέσα στα ουδετερόφιλα αποδεικνύει την φαγοκυττάρωση που υφίσταται το *H. pylori*. Δεξιά, απεικονίζονται με τα ίδια χρώματα τα αντίστοιχα της αριστερής εικόνας. Όπως φαίνεται, το *H. pylori* εντοπίζεται εκτός των ουδετερόφιλων, γεγονός που αποδεικνύει ότι απουσία οψωνοποίησης, τα ουδετερόφιλα δεν φαγοκυτταρώνουν το *H. pylori*. Single slice analysis. (Αρχική μεγέθυνση 63x).

### 6.3 Τα ουδετερόφιλα παράγουν ROS ύστερα από φαγοκυττάρωση των βακτηρίων *H. pylori*

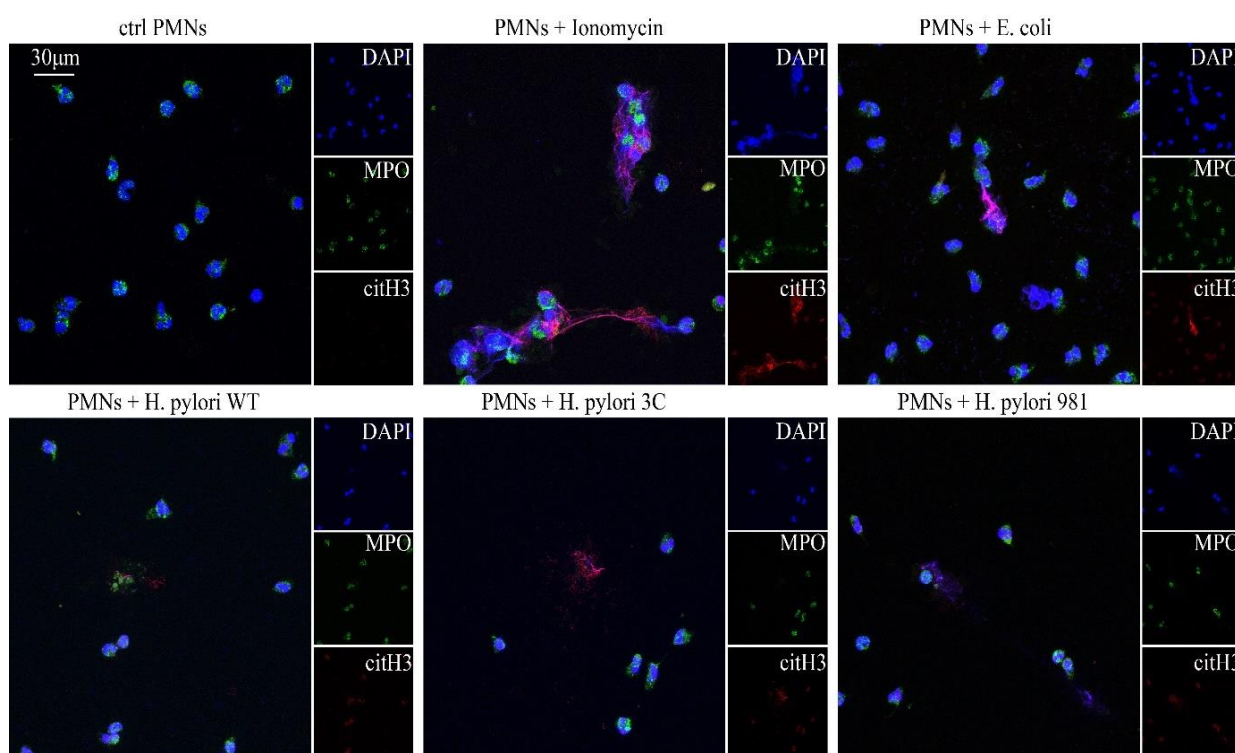
Στην συνέχεια διερευνήθηκε ο αντιμικροβιακός μηχανισμός των ουδετερόφιλων κυττάρων να επάγουν ROS στην *H. pylori* λοίμωξη. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα ουδετερόφιλα παράγουν ROS και μάλιστα αυτή η παραγωγή εξαρτάται από την φαγοκυττάρωση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 21, τα οψωνοποιημένα βακτηριακά στελέχη επάγουν την δημιουργία ROS, ενώ απουσία οψωνοποίησης δεν παράγονται ROS, όπως παρατηρήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Επίσης, σημαντικό εύρημα αποτελεί ότι με σίγαση του γονιδίου *cagA* μειώνεται η παραγωγή των ROS, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη CagA ενδεχομένως παίζει ρόλο στην παραγωγή των ROS. Από τα βακτηριακά στελέχη συγκρινόμενα μεταξύ τους σε συνθήκες οψωνοποίησης, μεγαλύτερες τιμές ROS δίνει το εργαστηριακό στέλεχος HpP12-CCC και το κλινικό στέλεχος Hp981.



**Εικόνα 21. Τα ουδετερόφιλα παράγουν ROS ύστερα από οψωνοποίηση στην *H. pylori* μόλυνση. A.** Κυτταρομετρία ροής για ROS σε ουδετερόφιλα μολυσμένα με διαφορετικά στελέχη *H. pylori* μετά από οψωνοποίηση και χωρίς. **B.** Μέσος όρος από μέση ένταση φθορισμού (MFI) ROS παραγόμενα από ουδετερόφιλα μολυσμένα με *H. pylori*. *E. coli* – θετικός μάρτυρας.

## 6.4 Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ασταθή NETs έναντι του *H. pylori*

Είναι γνωστό πως τα ουδετερόφιλα κύτταρα απελευθερώνουν NETs συμβάλλοντας στην φυσική ανοσιακή απόκριση του ξενιστή. Αυτός ο σύνθετος αντιμικροβιακός μηχανισμός των ουδετερόφιλων που περιγράφηκε πρόσφατα, μελετήθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη στην λοίμωξη από *H. pylori*. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι, έπειτα από μόλυνση βακτηριακών στελεχών *H. pylori* σε υγιή απομονωμένα, ανθρώπινα ουδετερόφιλα επάγεται ο μηχανισμός της NETosis. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μετά από την απελευθέρωσή τους τα NETs φαίνεται πως γίνονται ασταθή ("degraded") παρουσία του *H. pylori* (Εικόνα 22). Αυτό το αποτέλεσμα είναι πολύ χαρακτηριστικό, συγκρινόμενο με τους θετικούς μάρτυρες ιονομικίνη και *E. coli*. Αρχικά, για να διαπιστωθεί η ύπαρξη των NETs, ελέγχθηκε η ύπαρξη των πρωτεϊνών MPO και CitH3, που όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αποτελούν ένδειξη της παρουσίας των NETs. Με την απουσία των *H. pylori* βακτηριακών στελεχών στον αρνητικό Μάρτυρα, επιβεβαιώθηκε πως σχηματίστηκαν αντίστοιχα NETs, από τα ουδετερόφιλα κύτταρα, των οποίων η μορφολογία παρέμεινε φυσιολογική.



**Εικόνα 22. Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ασταθή NETs εναντίον *H. pylori* μόλυνσης.** Απεικόνιση NETs σε ουδετερόφιλα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από *H. pylori* σε συνεστιακή μικροσκοπία. Με μπλε χρώμα (DAPI) σημάνθηκε το DNA των ουδετερόφιλων κυττάρων, συγκεκριμένα το δίκτυο αποσυμπυκνωμένης χρωματίνης που δημιουργήθηκε από τα ουδετερόφιλα, με πράσινο χρώμα σημάνθηκε η MPO και με κόκκινο η CitH3. Στον αρνητικό μάρτυρα η μορφή των πυρήνων και η μορφολογία των κυττάρων παραμένει άθικτη απουσία του *H. pylori*. Στους θετικούς μάρτυρες ιονομικίνη και *E. coli*, στα σημεία με διάχυτο DNA, φαίνονται



τα NETs. Υπάρχει συνεντοπισμός του DNA με τις MPO (πράσινο χρώμα) και citH3 (κόκκινο χρώμα), ένδειξη πως έχουν ξεκάθαρα σχηματιστεί τα χαρακτηριστικά εξωκυττάρια δίκτυα χρωματίνης. Στα σημεία επιμόλυνσης των ουδετερόφιλων με τα βακτηριακά στελέχη: HpP12, HpP12-CCC και Hp981, φαίνεται χαμηλής έντασης και έκτασης αλληλοεπικάλυψη του DNA με τις MPO (πράσινο χρώμα) και citH3 (κόκκινο χρώμα), δηλαδή να έχουν σχηματιστεί NETs ως απόκριση στην *H. pylori* λοίμωξη αλλά έχουν ήδη γίνει "degraded" σε σύγκριση με τους Μάρτυρες. (Αρχική μεγέθυνση 20x).

## Δ. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε για πρώτη φορά η μελέτη της ανοσιακής απόκρισης των ουδετερόφιλων ως προς την *H. pylori* λοίμωξη σε *in vitro* συνθήκες. Για αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν διάφορα εργαστηριακά στελέχη *H. pylori* καθώς και ένα κλινικό, το οποίο είχε πρόσφατα απομονωθεί από ασθενή. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα ουδετερόφιλα κύτταρα μπορούν να φαγοκυτταρώσουν το *H. pylori* και μάλιστα η φαγοκυττάρωση, ως αντιμικροβιακός μηχανισμός, εξαρτάται από την οψωνοποίηση. Επίσης, τα ουδετερόφιλα παράγουν ROS και αυτή επάγεται μέσω της φαγοκυττάρωσης. Παράλληλα, φάνηκε πως απουσία της CagA μειώνεται η παραγωγή των ROS, εύρημα που καταδεικνύει πως η CagA ενδεχομένως να παίζει ρόλο στην παραγωγή τους. Τέλος, η μόλυνση των ουδετερόφιλων κυττάρων με *H. pylori* οδηγεί στον σχηματισμό NETs τα οποία όμως είναι ασταθή. Αυτό δείχνει πως ενώ τα ουδετερόφιλα διεκπεραιώνουν μια σειρά αμυντικών μηχανισμών ενάντια στο *H. pylori*, η αποτελεσματικότητά τους δεν είναι βέβαιη.

Η φλεγμονώδης αντίδραση αν και είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών ωστόσο μπορεί να έχει και ανεπιθύμητες παρενέργειες για τον οργανισμό. Επομένως είναι απαραίτητη η ρύθμιση της καλής λειτουργίας της φλεγμονής για την εξοικονόμηση ενέργειας και για την καλή υγεία του οργανισμού. Τα ουδετερόφιλα, ως τα πρώτα κύτταρα τα οποία στρατολογούνται στα σημεία φλεγμονής, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Δεν είναι σαφές αν αυτή η ετερογένεια αντανakλά διαφορετικές καταστάσεις ενεργοποίησης ή πραγματικούς υποπληθυσμούς των ουδετερόφιλων. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε η παραγωγή ROS από ουδετερόφιλα που φαγοκυτταρώνουν διάφορες *H. pylori* σειρές. Τα ROS, ως συνέπεια της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, προκαλούν θραύσεις διπλής έλικας του βακτηριακού DNA (double-stranded brakes). Τα επιθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA και επάγουν θραύσεις διπλής έλικας μέσα στα βακτηριακά χρωμοσώματα, στον γαστρικό βλεννογόνο των μολυσμένων με *H. pylori*. Όπως και σε άλλα παθογόνα βακτήρια, έτσι και στο *H. pylori*, απαιτείται επιδιόρθωση των βλαβών DNA, ώστε να αποτραπεί η βλάβη που προκαλείται από τον ξενιστή και να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα και ο αποικισμός του ελικοβακτηρίου του πυλωρού. Η αποτυχία επισκευής αυτών των βλαβών περιορίζει τον βακτηριακό αποικισμό στον στόμαχο. Για να αποκατασταθεί η βλάβη και άρα να επιβιώσει το *H. pylori*, απαιτείται ομόλογος ανασυνδυασμός. Η μεταβολή της έκφρασης σε μια σειρά πρωτεϊνών στην επιφάνεια των κυττάρων του *H. pylori* επέρχεται από την γονιδιακή μετατροπή του *babA*. Αυτή η αλλαγή την κυτταρική επιφάνεια, επιτρέπει στο *H. pylori*, να αποφύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και να προωθήσει τον αποτελεσματικό αποικισμό του στομάχου από το *H. pylori*. Η

επιδιόρθωση θραύσεων διπλής έλικας περιλαμβάνει την δράση της νουκλεάσης και της ελικάσης, που παρέχεται από δύο ένζυμα AddAB και RecBCD. Αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούν πολύπλοκες δραστηριότητες ώστε να αποκαταστήσουν τις βλάβες του DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού [127].

Βάσει των μελετών που έχουν διεξαχθεί για την ύπαρξη και την δημιουργία των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης σε άλλες ασθένειες (λοιμώδεις, φλεγμονώδεις, αυτοάνοσες) ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η ύπαρξη τους ως ανοσολογική απάντηση και στην λοίμωξη από *H. pylori*. Λαμβάνοντας υπόψιν προηγούμενα πειράματα της ομάδας που κατέδειξαν την ύπαρξη των NETs στο γαστρικό επιθήλιο με φλεγμονή από το *H. pylori*, στην παρούσα διπλωματική εργασία, διαμολύνθηκαν ουδετερόφιλα κύτταρα με στελέχη *H.pylori in vitro*, για πρώτη φορά. Τα NETs που επάγονται από τα ουδετερόφιλα ως ανοσιακή απόκριση στην λοίμωξη από *H. pylori*, είναι ασταθή "degraded", σε σχέση τους παράγοντες λοίμωξης: ιονομικίνη, *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στην παρούσα εργασία και σε σύγκριση με τα NETs που έχουν μελετηθεί σε άλλες ασθένειες. Αυτό το φαινόμενο πιθανόν οφείλεται στο ότι το *H. pylori* μπορεί να αποσυνθέτει τα NETs μέσω της πέψης της χρωματίνης, καθώς διαθέτει βακτηριακές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν δραστηριότητα νουκλεάσης (DNase) [128], [129]. Πρέπει ωστόσο να διερευνηθεί περαιτέρω η ικανότητα των ουδετερόφιλων να σχηματίζουν NETs, καθώς τα NETs είναι τόσο ωφέλιμα, όσο και επιζήμια, είναι σημαντικό να μελετηθεί αν τα ουδετερόφιλα κύτταρα μπορούν να στοχεύσουν στην αναστολή των επιβλαβών ενεργειών αφήνοντας ανέπαφες τις ευεργετικές τους ιδιότητες [94]. Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που αφορούν τα ουδετερόφιλα είναι δύσκολη. Η μελέτη τους περιορίζεται από την σύντομη διάρκεια ζωής αυτών των κυττάρων και την έλλειψη των καθιερωμένων κυτταρικών σειρών που αναπαράγουν πιστά τη βιολογία των κοκκιοκυττάρων, η οποία αποκλείει πολλές συμβατικές μοριακές προσεγγίσεις [88].

Επίσης, η γενετική ανάλυση του βακτηρίου υποδεικνύει πως το *H. pylori* δεν έχει αρκετά γονίδια τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης *de novo* νουκλεοτιδικών πουρινών και ότι είναι ανίκανο να παράγει δακτυλίους πουρινών. Η φυσιολογία και ο μεταβολισμός του *H. pylori* υποδεικνύουν πως το βακτήριο χρειάζεται τις πουρίνες για να αναπτυχθεί *in vitro* και για το λόγο αυτό, συλλέγει τις πουρίνες από το εξωκυττάριο DNA χρησιμοποιώντας την εξωτερική μεμβράνη που συνδέεται με την νουκλεάση NucT, μία κυρίαρχη νουκλεάση που παράγεται από το *H. pylori*. Η ικανότητα να διασπά και να επεξεργάζεται το εξωκυττάριο DNA είναι επωφελής για τα παθογόνα, ειδικά σε συνθήκες περιορισμένων θρεπτικών συστατικών *in vitro*. Η NucT αποδείχθηκε να υποβαθμίζει τα νουκλεϊκά οξέα μέσω της ενδονουκλεολυτικής της δράσης, σε μονόκλωνα και δίκλωνα υποστρώματα και μάλιστα είναι ικανή να υποβαθμίζει και το RNA υδρολύοντας το. Η NucT

εκκρίνεται και συνδέεται με τη βακτηριακή εξωτερική μεμβράνη, καθώς το *H. pylori* απαιτεί την πρωτεΐνη να βρίσκεται σε κοντινή απόσταση ώστε να αποφευχθεί η απόσπαση της νουκλεάσης από το γαστρικό βλεννογόνο του εντέρου. Αυτό το φαινόμενο επιτρέπει στο βακτήριο να περιβάλλεται από νουκλεάση και να αποικοδομεί τα NETs. Μόλις διασπαστεί το DNA, οι βάσεις πουρίνης μπορούν να περάσουν εύκολα από την εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου στην εσωτερική. Η NucT αυξάνει άμεσα το βαθμό μετατροπής του DNA από το βακτήριο. Όλα τα εργαστηριακά και κλινικά στελέχη του *H. pylori* αναπτύσσονται καλύτερα *in vitro* παρουσία αδενίνης [130]. Αν και δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες που να μετρούν τις ελεύθερες πουρίνες στην γαστρική βλέννα, αρκετές μελέτες αναφέρουν την παρουσία εξωκυττάρου DNA στο γαστρικό βλεννογόνο λόγω κυρίως της εναλλαγής των επιθηλιακών κυττάρων. Αυτές οι συγκεντρώσεις του DNA χρησιμοποιήθηκαν μία φορά για να δείξουν τον αριθμό εναλλαγής των επιθηλιακών κυττάρων και βρέθηκε πως οι ασθενείς που διαγνώστηκαν με γαστρίτιδα παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά εξωκυττάρου DNA στην γαστρική τους βλέννα [131], [132]. Το *H. pylori* χρησιμοποιεί αυτό το DNA ως πηγή πουρινών ώστε και να αναπτυχθεί και χωρίς να προκαλεί την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Παρουσία ελεύθερων πουρινών, τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν ένα μέρος, περιορίζοντάς έτσι τη παρουσία τους, αλλά το *H. pylori* φαίνεται ότι είναι ικανό να προσλάβει αυτές που παραμένουν. Ωστόσο, χωρίς την παρουσία των εξωκυττάρων νουκλεασών τα κύτταρα του ξενιστή δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το εξωκυττάρου DNA για το δικό τους μεταβολισμό των πουρινών. Οπότε τα παθογόνα βρίσκουν αυτήν την πηγή πουρινών ιδανική για την ανάπτυξη τους και πλεονεκτούν στην ανάπτυξη τους, έναντι των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το *H. pylori* πλεονεκτεί έναντι των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων διότι αποδεκατίζει τα NETs ώστε να χρησιμοποιήσει τις πουρίνες. Πιστεύεται πως για την αποδόμηση του εξωκυττάρου DNA στο στόμαχο απαιτείται και μια επιπρόσθετη εξωτερική πηγή, όπως είναι οι εκκρινόμενες βακτηριακής φύσης νουκλεάσες DNases, η δραστηριότητα των οποίων ενισχύει την λοιμοτοξική ικανότητα του *H. pylori*, επιτρέποντας στο βακτήριο να ανοσοδιαφεύγει και κυρίως αποδομώντας τα ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης. Η παρουσία της DNase I στον ορό πιστεύεται πως μετακινεί τα NETs. Επίσης, εκτός από την ανοσοδιαφυγή η αποδόμηση του DNA μπορεί να διαδραματίσει έναν πιο άμεσο ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, επηρεάζοντας άμεσα τη γενετική ακεραιότητα των μεμονωμένων κυττάρων του ξενιστή. Το *H. pylori* έχει δείχθει ότι προκαλεί χρωμοσωμικές βλάβες σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές AGS, φαινόμενο που απαιτεί προσκόλληση του βακτηρίου στα κύτταρα του ξενιστή, χωρίς να απαιτείται απαραίτητα η ενδοκυττάρια διαμετάθεση της πρωτεΐνης CagA μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου IV (T4SS) [130].

Οι μηχανισμοί που αποδομούν τα NETs δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Κατά την διάρκεια της λοίμωξης, τα NETs παραμένουν για αρκετές ημέρες και πιστεύεται πως αποδομούνται από την DNase I. Ωστόσο οι μηχανισμοί εκκαθάρισης των NETs από ενδογενή ένζυμα παραμένουν άγνωστοι. Είναι όμως γνωστό πως οι πρωτεΐνες των NETs επιμένουν πολύ μετά την αποικοδόμηση των NETs, γεγονός που υποδηλώνει πως πιθανόν και άλλοι μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα στην εκκαθάρισή τους [95], [97].

Προκειμένου να μελετηθεί το επαγόμενο φαινόμενο σχηματισμού, παραμονής και εκκαθάρισης των NETs με έναν σφαιρικά ολοκληρωμένο τρόπο, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για την κατανόηση και μελέτη του τρόπου δράσης των ουδετερόφιλων μέσω του μηχανισμού των εξωκυττάρων δικτύων τους ενάντια στο *H. pylori*. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα βακτηριακά στελέχη για σύγκριση των αποτελεσμάτων. Θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου προσλαμβάνεται η εξωτερική νουκλεάση από ένα κύτταρο και προκαλεί βλάβη στον ενδοκυττάριο DNA ώστε να αποσαφηνιστεί η ακριβής βακτηριακή αιτία που αποδεκατίζει τα ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης τα οποία δημιουργούνται κατά την μόλυνση με *H. pylori*. Ο μοριακός μηχανισμός εκκαθάρισης των NETs παραμένει αδιευκρίνιστος και χρήζει περαιτέρω έρευνας. Επίσης, πρέπει να διευρυνθεί περαιτέρω η ικανότητα των NETs να παραμένουν στο σημείο της φλεγμονής και μετά το πέρας της λοίμωξης ή ακόμα και μετά την εκρίζωση του *H. pylori*, προκαλώντας τραυματισμό του ενδοθηλίου, καθώς και βλάβες και αναδιαμόρφωση στους ιστούς, διατηρώντας την φλεγμονή, ώστε να στοχευθεί η αναστολή των επιβλαβών ενεργειών, αφήνοντας ανέπαφες τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Επίσης, απαιτείται η περαιτέρω μελέτη στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, ώστε να αποσαφηνιστούν οι δραστηριότητες της νουκλεάσης και της ελικάσης του *H. pylori* στην επιδιόρθωση, στον ανασυνδυασμό και την μολυσματικότητα του ελικοβακτηρίου του πυλωρού. Τέλος, ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον θα είχε η χρήση ανθρώπινων οργανοειδών και εντεροειδών ή κολονοειδών ("mini-guts") προερχόμενα από βλαστοκύτταρα που απομονώνονται από το λεπτό έντερο ή το κόλον, για να μελετηθεί η *in vivo* εντερική βακτηριακή παθογένεια. Για να προσομοιωθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια του γαστρεντερικού τμήματος *in vivo*, θα ήταν χρήσιμο να ενσωματωθούν στα οργανοειδή, αρκετοί γειτονικοί κυτταρικοί τύποι, ώστε να μπορέσει με ακρίβεια να μελετηθεί η δημιουργία των NETs στην μόλυνση από *H. pylori*.

Η παραπάνω μελέτη μας δείχνει τον τρόπο αντίδρασης των ουδετερόφιλων έναντι του *H. pylori*, που μελετήθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως. Τα αποτελέσματα δίνουν ένα νέο πρίσμα για την ουδετεροφιλική ανοσία του ξενιστή ενάντια στην *H. pylori* λοίμωξη. Η πιθανή παρατεταμένη παρουσία των NETs στο σημείο της φλεγμονής, μετά το πέρας της ανοσολογικής απόκρισης και την

εκρίζωση του ελικοβακτηρίου του πυλωρού συμβάλλει στην χρόνια φλεγμονή που επηρεάζει την παθοφυσιολογία της λοίμωξης. Περαιτέρω μελέτη για την διερεύνηση του φαινομένου καθώς και του τρόπου που η χρόνια φλεγμονή συμβάλλει στην δημιουργία καρκίνου στο χόριο του γαστρικού βλεννογόνου θα μπορούσε να αποτελέσει συνέχεια επιστημονικής έρευνας.

## ΣΤ. Βιβλιογραφία

- [1] D. R. Cave, “How is helicobacter pylori transmitted?,” *Gastroenterology*, vol. 113, no. 6 SUPPL., pp. S9–S14, 1997, doi: 10.1016/S0016-5085(97)80004-2.
- [2] J. R. Warren, “Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis.,” *Lancet* 1 1273-5, pp. 1273–1275, 1967, doi: doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92719-8.
- [3] S. K. L. & J. A.-M. J. R. LAMBERT, “Helicobacter pylori,” *Gastroenterology*, vol. 38, no. 3, pp. 208:33–46, 1995, doi: 10.3109/00365529509107760.
- [4] J. P. and R. R. Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, “Helicobacter pylori Virulence and Genetic Geography,” *Sci.* 284(5418), vol. 1328–1333, no. 1999, 1999, doi: 10.1126/science.284.5418.1328.
- [5] V. Conteduca, D. Sansonno, G. Lauletta, S. Russi, G. Ingravallo, and F. Dammacco, “H . pylori infection and gastric cancer : State of the art ( Review ),” *Int. J. Oncol.*, vol. 42, no. 1, pp. 5–18, 2013, doi: 10.3892/ijo.2012.1701.
- [6] G. Bizzozero, “Ueber die schlauchfōrmigen Drūsen des Magendarm\_kanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflāchenepithel derSchleimhaut. Dritte mitteilung.,” *Arch. Mikroskopische Anat.*, vol. 43:82–152., 1893.
- [7] Pel PK., “Diseases of the stomach. De Erven Bohn, Amsterdam, The Netherlands. (In Dutch.),” 1899.
- [8] A. Luger, “Ueber spirochaeten und fusiforme bazillen im darm, miteiner beitrage zur frage der lamblien-enteritis. Wien. Klin. Wochenschr.,” no. 52:, pp. 1643–1647., 1917.
- [9] B. Rigas, C. Feretis, and E. D. Papavassiliou, “John Lykoudis: An unappreciated discoverer of the cause and treatment of peptic ulcer disease,” *Lancet*, vol. 354, no. 9190, pp. 1634–1635, 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(99)06034-1.
- [10] R. J. G. Marshall, B. J., J. A. Armstrong, D. B. McGeachie, “Attempt to fulfil Koch’s postulates for pyloric Campylobacter.,” *Med. J. Austr.*, no. 142:, pp. 436–439, 1985.
- [11] B. J. Marshall, D. B. McGeachie, P. A. Rogers, and R. J. Glancy, “Pyloric campylobacter infection and gastroduodenal disease,” *Med. J. Aust.*, vol. 142, no. 8, pp. 439–444, 1985, doi: 10.5694/j.1326-5377.1985.tb113444.x.
- [12] C. S. Goodwin *et al.*, “Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb.

- nov., respectively,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 39, no. 4, pp. 397–405, 1989, doi: 10.1099/00207713-39-4-397.
- [13] J. G. Kusters, A. H. M. Van Vliet, and E. J. Kuipers, “Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 3, pp. 449–490, 2006, doi: 10.1128/CMR.00054-05.
- [14] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis, “Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. June, pp. 4576–4579, 1990, [Online]. Available: 10.1073/pnas.87.12.4576.
- [15] R. J. Owen, “*Helicobacter* - species classification and identification From *Campylobacter* to *Helicobacter*,” *Br. Med. Bull.*, vol. 54, no. 1, pp. 17–30, 1998, [Online]. Available: doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011667.
- [16] B. Mateos-muñoz *et al.*, “Enterohepatic *Helicobacter* other than *Helicobacter pylori*,” *Rev Esp Enferm Dig.*, vol. 105, no. (8):, pp. 477–484, 2013, [Online]. Available: doi: 10.4321/s1130-01082013000800006.
- [17] J. G. Fox, “*H. pylori*,” vol. *Gut* 50:, pp. 273–283, 2002, [Online]. Available: 10.1136/gut.50.2.273.
- [18] M. Achtman *et al.*, “MicroGenomics Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions,” vol. 32, pp. 459–470, 1999.
- [19] D. Falush *et al.*, “Traces of Human Migrations in *Helicobacter pylori* Populations,” vol. 1582, no. 2003, 2014, doi: 10.1126/science.1080857.
- [20] J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. A. G. Van Strijp, and C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, “Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death,” *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 9, pp. 3672–3679, 1997, doi: 10.1128/iai.65.9.3672-3679.1997.
- [21] M. J. B. B. E. Dunn, Cohen H., “*Helicobacter pylori*,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 4, pp. 720–741, 1997, doi: 10.1128/cmr.10.4.720.
- [22] A. P. Moran, Y. A. Knirel, S. F. Y. N. Senchenkova, G. Widmalm, S. O. Hynes, and P. E. Jansson, “Phenotypic variation in molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in LewisX and LewisY expression by *H. pylori* lipopolysaccharides,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 8, pp. 5785–5795, 2002, doi: 10.1074/jbc.M108574200.



- [23] D. R. Scott, E. A. Marcus, D. L. Weeks, and G. Sachs, “Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*,” *Gastroenterology*, vol. 123, no. 1, pp. 187–195, 2002, doi: 10.1053/gast.2002.34218.
- [24] S. W. Han *et al.*, “Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 4, pp. 349–352, 1995, doi: 10.1007/BF02116531.
- [25] J. W. Olson and R. J. Maier, “Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*,” *Science (80-. )*, vol. 298, no. 5599, pp. 1788–1790, 2002, doi: 10.1126/science.1077123.
- [26] J. C. Dent and C. A. M. McNulty, “Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. 555–558, 1988, doi: 10.1007/BF01962615.
- [27] Skirrow MB, “*Campylobacter* enteritis: a ‘new’ disease.” *Br. Med. J.*, vol. 2:, pp. 9–11, 1977.
- [28] D. J. Reynolds and C. W. Penn, “Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements,” *Microbiology*, vol. 140, no. 10, pp. 2649–2656, 1994, doi: 10.1099/00221287-140-10-2649.
- [29] Z. Y. Muñoz-Ramírez *et al.*, “Whole genome sequence and phylogenetic analysis show *Helicobacter pylori* strains from Latin America have followed a unique evolution pathway,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. FEB, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00050.
- [30] M. Stein, P. Ruggiero, R. Rappuoli, and F. Bagnoli, “*Helicobacter pylori* CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine,” *Front. Immunol.*, vol. 4, doi: 10.3389/fimmu.2013.00328.
- [31] M. Moyat and D. Velin, “Immune responses to *Helicobacter pylori* infection,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 19, pp. 5583–5593, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5583.
- [32] L. M. Brown, “*Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission,” *Epidemiol. Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 283–297, 2000, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040.
- [33] H. M. Malaty and D. Y. Graham, “Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection,” *Gut*, vol. 35, no. 6, pp. 742–745, 1994, doi: 10.1136/gut.35.6.742.

- [34] M. L. Replogle, S. L. Glaser, R. A. Hiatt, and J. Parsonnet, “Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Healthy young adults,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 142, no. 8, pp. 856–863, 1995, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a117725.
- [35] S. S. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, “Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations.,” *Science.*, no. 7, pp. 299(5612):1582–5, 2003, doi: 10.1126/science.1080857.
- [36] S. Kayali *et al.*, “*Helicobacter pylori* , transmission routes and recurrence of infection : state of the art,” vol. 89, no. 6, pp. 72–76, 2018, doi: 10.23750/abm.v89i8-S.7947.
- [37] D. Rothenbacher *et al.*, “*Helicobacter pylori* among Preschool Children and Their Parents : Evidence of Parent-Child Transmission,” no. July 1997, pp. 398–402, 1999.
- [38] K. J. Goodman, P. Correa, and S. Commentary, “Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings,” vol. 355, pp. 358–362, 2000.
- [39] N. C. Quaglia and A. Dambrosio, “*Helicobacter pylori* : a foodborne pathogen ?,” vol. 24, no. 31, pp. 3472–3487, 2018, doi: 10.3748/wjg.v24.i31.3472.
- [40] M. P. Dore *et al.*, “Isolation of *helicobacter pylori* from sheep - Implications for transmission to humans,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 96, no. 5, pp. 1396–1401, 2001, doi: 10.1016/S0002-9270(01)02335-8.
- [41] D. Heuermann and R. Haas, “Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*,” *Gene*, vol. 165, no. 1, pp. 17–24, 1995, doi: 10.1016/0378-1119(95)00469-M.
- [42] R. M. Peek and M. J. Blaser, “*Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 28–37, 2002, doi: 10.1038/nrc703.
- [43] M. P. Suerbaum S, “*Helicobacter pylori* infection.,” *N Engl J Med.*, vol. 347, no. (15):, pp. 1175–1186, 2002, doi: 10.1056/NEJMra020542.
- [44] P. Malfertheiner, F. K. L. Chan, and K. E. L. Mccoll, “Peptic ulcer disease,” *Lancet*, vol. 374, no. 9699, pp. 1449–1461, 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60938-7.
- [45] Y. Y. Sgouras DN, Trang TT, “Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection,” *Helicobacter.*, vol. Suppl 1(0, no. 01, p. :8-16., 2015, doi: 10.1111/hel.12251.
- [46] D. R. Bridge and D. Scott Merrell, “Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and

- VacA toxins and disease,” *Gut Microbes*, vol. 4, no. 2, pp. 101–117, 2013, doi: 10.4161/gmic.23797.
- [47] P. Sipponen and H. Maaros, “Chronic gastritis,” no. January, pp. 657–667, 2015, doi: 10.3109/00365521.2015.1019918.
- [48] M. S. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Peña AS, Hazenberg HJ, Bloemena E, Lindeman J, Klinkenberg-Knol EC, “Increase of Helicobacter pylori-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety,” *Am J Gastroenterol.*, vol. 90, no. 9, p. :1401-6, 1995.
- [49] M. J. Blaser and J. C. Atherton, “Helicobacter pylori persistence : biology and disease,” no. 3, pp. 321–333, 1994, doi: 10.1172/JCI200420925.The.
- [50] B. Bauer and T. F. Meyer, “ The Human Gastric Pathogen Helicobacter pylori and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease ,” *Ulcers*, vol. 2011, pp. 1–23, 2011, doi: 10.1155/2011/340157.
- [51] E. Kontizas *et al.*, “Impact of Helicobacter pylori Infection and Its Major Virulence Factor CagA on DNA Damage Repair,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 12, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8122007.
- [52] S. S. Yoon, D. G. Coit, C. S. Portlock, and M. S. Karpeh, “The diminishing role of surgery in the treatment of gastric lymphoma,” *Ann. Surg.*, vol. 240, no. 1, pp. 28–37, 2004, doi: 10.1097/01.sla.0000129356.81281.0c.
- [53] M. P. Dore, G. M. Pes, G. Bassotti, and P. Usai-Satta, “Dyspepsia: When and how to test for helicobacter pylori infection,” *Gastroenterol. Res. Pract.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8463614.
- [54] J. C. Yang, C. W. Lu, and C. J. Lin, “Treatment of Helicobacter pylori infection: Current status and future concepts,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 18, pp. 5283–5293, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5283.
- [55] B. B. De Brito *et al.*, “Pathogenesis and clinical management of Helicobacter pylori gastric infection,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 25, no. 37, pp. 5578–5589, 2019, doi: 10.3748/wjg.v25.i37.5578.
- [56] D. S. K. and R. Rike Syahniar, *Vaccine Development*. 2021.
- [57] D. Sgouras *et al.*, “In Vitro and In Vivo Inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus

- casei Strain Shirota,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 1, pp. 518–526, 2004, doi: 10.1128/AEM.70.1.518-526.2004.
- [58] C. Montecucco and R. Rappuoli, “Living dangerously: How helicobacter pylori survives in the human stomach,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 6, pp. 457–466, 2001, doi: 10.1038/35073084.
- [59] E. D. J. Graham DY, Go MF, “Review article: urease, gastric ammonium/ammonia, and Helicobacter pylori--the past, the present, and recommendations for future research,” *Aliment Pharmacol Ther.*, p. Dec;6(6):659-69., 1992, doi: 10.1111/j.1365-2036.1992.tb00730.x.
- [60] A. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., & Covacci, “cag , a pathogenicity island of Helicobacter pylori , encodes type I-specific and disease-associated virulence factors,” *Proc. Natlional Acad. Sci. USA*, vol. 93, no. 25, pp. 14648–14653, 1996, doi: 10.1073/pnas.93.25.14648.
- [61] D. N. Sgouras *et al.*, “CagA and VacA Polymorphisms Do Not Correlate with Severity of Histopathological Lesions in Helicobacter pylori-Infected Greek Children,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 8, pp. 2426–2434, 2009, doi: 10.1128/JCM.00159-09.
- [62] Takahashi-Kanemitsu Atsushi and H. M. Knight T. Christopher, “Molecular anatomy and pathogenic actions of Helicobacter pylori CagA that underpin gastric carcinogenesis,” *Cell. Mol. Immunol.*, no. 17:, pp. 50–63, 2020, doi: 10.1038/s41423-019-0339-5.
- [63] D. M. Bronte-Tinkew *et al.*, “Helicobacter pylori CagA activates the Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) pathway in vitro and in vivo,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 2, pp. 632–639, 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1191.
- [64] I. N. A. Tammer, S. Brandt, R. Hartig, W. König, and S. Backert, “Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering,” *Gastroenterology*, vol. 132, no. 4, pp. 1309–1319, 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.050.
- [65] A. Covacci *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.*, vol. 90, no. 12, pp. 5791–5795, 1993, doi: 10.1073/pnas.90.12.5791.
- [66] H. Higashi *et al.*, “Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 22, pp. 14428–14433, 2002, doi: 10.1073/pnas.222375399.

- [67] K. S. Papadakos, I. S. Sougleri, A. F. Mentis, E. Hatziloukas, and D. N. Sgouras, “Presence of Terminal EPIYA Phosphorylation Motifs in *Helicobacter pylori* CagA Contributes to IL-8 Secretion, Irrespective of the Number of Repeats,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0056291.
- [68] M. Suzuki, H. Mimuro, T. Suzuki, M. Park, T. Yamamoto, and C. Sasakawa, “Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion,” *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 9, pp. 1235–1247, 2005, doi: 10.1084/jem.20051027.
- [69] M. R. Shokrzadeh, L., Baghaei, K., Yamaoka, Y., Dabiri, H., Jafari, F., Sahebkhitiari, N., Tahami, A., Sugimoto, M., Zojaji, H., & Zali, “Analysis of 3'-end variable region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian population,” *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 172–177, 2010, doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05979.x.
- [70] M. Hatakeyama, “ONCOGENIC MECHANISMS OF THE HELICOBACTER PYLORI CagA PROTEIN,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. September, pp. 688–694, 2004, doi: 10.1038/nrc1433.
- [71] H. M. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM Jr, Azuma T, “*Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the b-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells,” *Oncogene*, vol. 26, no. (32):, pp. 4617–4626, 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210251.
- [72] L. Buti, E. Spooner, A. G. Van Der Veen, R. Rappuoli, and A. Covacci, “*Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A ( CagA ) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 ( ASPP2 ) tumor suppressor pathway of the host,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 22, pp. 9238–43, 2011, doi: 10.1073/pnas.1106200108.
- [73] W. G. V. van Doorn, L. J.; Figueiredo, C.; Rossau, R.; Jannes, G.; van Asbroeck, M.; Sousa, J. C.; Carneiro, F.; Quint, “Typing of *Helicobacter pylori vacA* Gene and Detection of *cagA* Gene by PCR and Reverse Hybridization,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 5, pp. 1271–1276, 1998, doi: 10.1128/JCM.36.5.1271-1276.1998.
- [74] N. Chauhan, A. Chin, Y. Tay, B. J. Marshall, and U. Jain, “*Helicobacter pylori VacA* , a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells : An overview,” *Helicobacter.*, no. September, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1111/hel.12544.

- [75] K. Palframan, Samuel L.; Kwok, Terry; Gabriel, “Vacuolating cytotoxin A ( VacA ), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis,” *Front Cell Infect Microbiology*, vol. 2, no. July, pp. 1–9, 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00092.
- [76] M. Abdullah, L. K. Greenfield, D. Bronte-Tinkew, M. I. Capurro, D. Rizzuti, and N. L. Jones, “VacA promotes CagA accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37095-4.
- [77] D. K. Salim, M. Sahin, S. Köksoy, H. Adanir, and I. Süleymanlar, “Local Immune Response in *Helicobacter pylori* Infection,” *Med. (United States)*, vol. 95, no. 20, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1097/MD.0000000000003713.
- [78] A. C. T. Cadamuro, A. F. T. Rossi, N. M. Maniezzo, and A. E. Silva, “*Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and MicroRNAs,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 6, pp. 1424–1437, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i6.1424.
- [79] K. T. Wilson and J. E. Crabtree, “Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights Into the Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies,” *Gastroenterology*, vol. 133, no. 1, pp. 288–308, 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.008.
- [80] M. Aspholm *et al.*, “SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans,” *PLoS Pathog.*, vol. 2, no. 10, pp. 0989–1001, 2006, doi: 10.1371/journal.ppat.0020110.
- [81] V. Necchi *et al.*, “Intracellular, Intercellular, and Stromal Invasion of Gastric Mucosa, Preneoplastic Lesions, and Cancer by *Helicobacter pylori*,” *Gastroenterology*, vol. 132, no. 3, pp. 1009–1023, 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.049.
- [82] S. Romagnani, “Th1/Th2 cells,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 5, no. 4, pp. 285–294, 1999, doi: 10.1097/00054725-199911000-00009.
- [83] T. B. Romero-Adrián *et al.*, “*Helicobacter pylori*: Bacterial factors and the role of cytokines in the immune response,” *Curr. Microbiol.*, vol. 60, no. 2, pp. 143–155, 2010, doi: 10.1007/s00284-009-9518-4.
- [84] H. M. S. Algood and T. L. Cover, “*Helicobacter pylori* Persistence : an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune Defenses,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 19, no. 4, pp. 597–613, 2006, doi: 10.1128/CMR.00006-06.
- [85] N. Ramarao, S. D. Gray-owen, S. Backert, and T. F. Meyer, “*Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components,” *Mol.*

- Microbiol.*, vol. 37, no. (6):, pp. 1389–1404, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02089.x.
- [86] B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, and A. Zychlinsky, “Neutrophil function: From mechanisms to disease,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 459–489, 2012, doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
- [87] N. Borregaard, “Neutrophils, from Marrow to Microbes,” *Immunity*, vol. 33, no. 5, pp. 657–670, 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
- [88] V. Brinkmann and A. Zychlinsky, “Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?,” *J. Cell Biol.*, vol. 198, no. 5, pp. 773–783, 2012, doi: 10.1083/jcb.201203170.
- [89] V. Kumar and A. Sharma, “Neutrophils: Cinderella of innate immune system,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1325–1334, 2010, doi: 10.1016/j.intimp.2010.08.012.
- [90] P. J. Blaser MJ, “Parasitism by the ‘slow’ bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia,” *J. Clin. Invest.*, no. (1):, pp. 4–8, 1994, doi: 10.1172/JCII17336.
- [91] V. Rungelrath, S. D. Kobayashi, and F. R. DeLeo, “Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches,” *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1002/wsbm.1458.
- [92] S. F. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, “Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis,” *J Leukoc Biol.*, vol. 59, no. (2):, pp. 229–240, 1996, doi: 10.1002/jlb.59.2.229.
- [93] V. Brinkmann *et al.*, “Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria,” *Science (80-. )*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535, 2004, doi: 10.1126/science.1092385.
- [94] G. Sollberger, D. O. Tilley, and A. Zychlinsky, “Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization,” *Dev. Cell*, vol. 44, no. 5, pp. 542–553, 2018, doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.019.
- [95] S. Boeltz *et al.*, “To NET or not to NET:current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps,” *Cell Death Differ.*, vol. 26, no. 3, pp. 395–408, 2019, doi: 10.1038/s41418-018-0261-x.

- [96] R. K. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, “NETopathies ? Unraveling the Dark Side of Old Diseases through Neutrophils,” *Front Immunol.*, no. 7:, p. 678, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2016.00678.
- [97] V. Papayannopoulos, “Neutrophil extracellular traps in immunity and disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 134–147, 2018, doi: 10.1038/nri.2017.105.
- [98] Seki M., “The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Infectious Diseases,” *J. Infect. Dis. Ther.*, vol. 05, no. 03, pp. 3–6, 2017, doi: 10.4172/2332-0877.1000321.
- [99] V. Papayannopoulos, K. D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky, “Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps,” *J Cell Biol*, vol. 191, no. 3, pp. 677–691, 2010, doi: 10.1083/jcb.201006052.
- [100] W. M. Nauseef, “The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling,” *Curr Opin Immunol.*, no. 60:, pp. 130–140, 2019, doi: 10.1016/j.coi.2019.05.006.
- [101] N. Mor-Vaknin *et al.*, “DEK-targeting DNA aptamers as therapeutics for inflammatory arthritis,” *Nat. Commun.*, vol. 8, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/ncomms14252.
- [102] M. L. Liu, X. Lyu, and V. P. Werth, “Recent progress in the mechanistic understanding of NET formation in neutrophils,” *FEBS J.*, vol. 27:10.1111, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1111/febs.16036.
- [103] Y. Wang *et al.*, “trap formation,” *J Cell Biol*, vol. 184, no. (2):, pp. 205–213, 2009, doi: 10.1083/jcb.200806072.
- [104] E. Kolaczkowska *et al.*, “Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 6673, 2015, doi: 10.1038/ncomms7673.
- [105] K. Martinod *et al.*, “Peptidylarginine deiminase 4 promotes age-related organ fibrosis,” *J Exp Med.*, vol. 214, no. (2):, pp. 439–458, 2017, doi: 10.1084/jem.20160530.
- [106] K. P. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisfleury Chevance A, Zhang K, Conly J, “Dynamic NETosis is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram\_Positive Infection,” *Nat Med.*, vol. 18, no. (9):, pp. 1386–1393, 2012, doi: 10.1038/nm.2847.Dynamic.



- [107] Z. A. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, “Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms,” *Cell Microbiol.*, vol. 8, no. (4):, pp. 668–676, 2006, doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x.
- [108] D. A. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, “*Leishmania donovani* Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps.,” *J Immunol.*, vol. 185, no. (7):, pp. 4319–4327, 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1000893.
- [109] A. S. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, “Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1.,” *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 1, pp. 109–116, 2012, doi: 10.1016/j.chom.2012.05.015.
- [110] A. R. Tall and M. Westerterp, “Inflammasomes, neutrophil extracellular traps, and cholesterol,” *J Lipid Res.*, vol. 60, no. (4):, pp. 721–727, 2019, doi: 10.1194/jlr.S091280.
- [111] K. M. Gupta S, “The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases,” *Nat Rev Nephrol*, vol. 12, no. 7, pp. 402–413, 2017, doi: 10.1038/nrneph.2016.71.
- [112] B. A. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, “Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.*,” *J Immunol*, vol. 187, no. 1, pp. 490–500, 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1100123.
- [113] S. P. Papadaki G, Kambas K, Choulaki C, Vlachou K, Drakos E, Bertsiias G, Ritis K, Boumpas DT, Thompson PR, Verginis P, “Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation,” *Eur J Immunol.*, vol. 46, no. 11, pp. 2542–2554, 2017, doi: 10.1002/eji.201646542.
- [114] B. D. Frangou E, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, Kambas K, Arelaki S, Angelidou I, Arampatzioglou A, Gakiopoulou H, Bertsiias GK, Verginis P, Ritis K, “REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A),” *Ann Rheum Dis.*, vol. 78, no. 2, pp. 238–248, 2019, doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213181.
- [115] R. K. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, Nakos K, Tsironidou V, Koffa M, Boumpas DT, “Neutrophil extracellular traps regulate IL-1  $\beta$  -mediated inflammation in familial Mediterranean

- fever.,” *Ann Rheum Dis.*, vol. 75, no. 1, pp. 269–277, 2016, doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205958.
- [116] O. Z. Cheng and N. Palaniyar, “NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. JAN, pp. 1–13, 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00001.
- [117] S. Berger-Achituv *et al.*, “A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. MAR, pp. 1–5, 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00048.
- [118] L. Erpenbeck and M. P. Schön, “Neutrophil extracellular traps: Protagonists of cancer progression?,” *Oncogene*, vol. 36, no. 18, pp. 2483–2490, 2017, doi: 10.1038/onc.2016.406.
- [119] S. Arelaki, A. Arampatzioglou, and K. Kambas, “Gradient Infiltration of Neutrophil Extracellular Traps in Colon Cancer and Evidence for Their Involvement in Tumour Growth,” pp. 1–13, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0154484.
- [120] T. Mohanty *et al.*, “A novel mechanism for NETosis provides antimicrobial defense at the oral mucosa,” *Blood*, vol. 126, no. 18, pp. 2128–2137, 2015, doi: 10.1182/blood-2015-04-641142.
- [121] D. A. Stakos *et al.*, “Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction,” *Eur. Heart J.*, vol. 36, no. 22, pp. 1405–1414, 2015, doi: 10.1093/eurheartj/ehv007.
- [122] R. K. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P, Ntinopoulou M, Sertaridou E, Tsironidou V, Tsigalou C, Tektonidou M, Konstantinidis T, Papagoras C, Mitroulis I, Germanidis G, Lambris JD, “Complement and tissue factor – enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis,” *J Clin Invest.*, vol. 130, no. 11, pp. 6151–6157, 2020, doi: 10.1172/JCI141374.
- [123] S. D. Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, “A mutagenesis method for the addition and deletion of highly repetitive DNA regions: the paradigm of EPIYA motifs in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori*.,” *Helicobacter.*, vol. 18, no. (3):, pp. 229–241, 2013, doi: 10.1111/hel.12029.
- [124] E. G. Panayotopoulou *et al.*, “Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 2, pp. 488–495, 2007, doi: 10.1128/JCM.01616-06.

- [125] H. C. Logan RP, Robins A, Turner GA, Cockayne A, Borriello SP, “A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells,” *J Immunol Methods.*, vol. 213, no. (1):, pp. 19–30, 1998, doi: 10.1016/s0022-1759(98)00018-0.
- [126] K. Kambas *et al.*, “Autophagy Mediates the Delivery of Thrombogenic Tissue Factor to Neutrophil Extracellular Traps in Human Sepsis,” *PLoS One*, vol. 7, no. 9, pp. 1–14, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0045427.
- [127] S. K. Amundsen, J. Fero, N. R. Salama, and G. R. Smith, “Dual nuclease and helicase activities *Helicobacter pylori* AddAB are required for DNA repair, recombination, and mouse infectivity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 25, pp. 16759–16766, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.005587.
- [128] E. Kolaczkowska *et al.*, “Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature,” *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1038/ncomms7673.
- [129] J. M. Kim *et al.*, “*Helicobacter pylori* HP0425 Targets the Nucleus with DNase I-Like Activity,” *Helicobacter*, vol. 21, no. 3, pp. 218–225, 2016, doi: 10.1111/hel.12271.
- [130] G. W. Liechti and J. B. Goldberg, “*Helicobacter pylori* salvages purines from extracellular host cell DNA utilizing the Outer Membrane-Associated nuclease NucT,” *J. Bacteriol.*, vol. 195, no. 19, pp. 4387–4398, 2013, doi: 10.1128/JB.00388-13.
- [131] C. N. Croft DN, Pollock DJ, “Cell loss from human gastric mucosa measured by the estimation of deoxyribonucleic acid (DNA) in gastric washings,” *Gut.*, vol. 7, no. (4), pp. 333–43, 1966, doi: 10.1136/gut.7.4.333.
- [132] W. Domschke, S. Domschke, J. Hagel, and L. Demling, “Gastric epithelial cell turnover , mucus production , and healing of gastric ulcers with carbenoxolone1,” *Gut. 1977*, vol. 18, no. (10), pp. 817–820, doi: 10.1136/gut.18.10.817.