

Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και γαστρίτιδα σε μοριακό επίπεδο

Ανδρέας Καραμέρης

Το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Επ*), ένα Gram αρνητικό τριχοφόρο βακτηρίδιο, είναι ο κατ' εξοχήν υπεύθυνος αιτιοπαθογόνος μικροοργανισμός της τύπου Β χρόνιας γαστρίτιδας.¹ Η λοίμωξη χαρακτηρίζεται από πολύμορφη φλεγμονώδη διήθηση τόσο του επιθηλίου όσο και του χορίου, με συμμετοχή ποικίλου αριθμού πολυμορφοκυττάρων λευκοκυττάρων. Ενεργοποίηση του φλεγμονώδους πληθυσμού προκαλείται από τοπική παραγωγή αντισωμάτων και κυτταροκινών, σπουδαιότερο ρόλο μεταξύ των οποίων διαδραματίζουν οι Ιντερλευκίνες 6 και 8 και ο Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων -α (TNF-α).²

Σειρά πειραμάτων αποδεικνύουν ότι το *Επ* διεγείρει τη φλεγμονώδη αντίδραση αποδεσμεύοντας παράγοντες ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων και προκαλώντας τη μετανάστευσή τους. Πρόσφατες εξ άλλου ερευνητικές εργασίες κατέδειξαν ότι διάφορες γαστρικές επιθηλιακές γραμμές παράγουν κυτταροκίνη IL-8 ως ανταπόκριση στην έκκριση Ιντερφερόνης γ και TNF-α.³ Επειδή οι κυτταροκίνες αυτές αυξάνονται ως απάντηση σε διέγερση από λοίμωξη σε *Επ* τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, φλεγμονή που έχει ως αίτιο τη λοίμωξη από *Επ* διεγείρει το γαστρικό επιθήλιο στο να παράγει διαβιβαστές που λαμβάνουν ενεργό μέρος στη διαδικασία της φλεγμονής.⁴ Οι παρατηρήσεις αυτές ισχυροποιούνται από το γεγονός ότι το γαστρικό επιθήλιο εκκρίνει αυξημένα επίπεδα λακτοφερίνης, λυσοζύμης, πολυμερή υποδοχέα ανοσοσφαιρίνης και μορίων MHC II.⁵

Μοριακή προσέγγιση της γαστρίτιδας - πειραματικό μοντέλο

Φάσεις πειράματος

1. Επιλογή επιθηλιακών κυττάρων

Για τη δημιουργία του πειραματικού μοντέλου γαστρίτιδας από *Επ* επιλέχθηκε η επιθηλιακή κυτταροσειρά ΚΑΤΟ III (κύτταρα γαστρικού επιθηλίου), η προμήθεια της οποίας έγινε από την ATCC (Rockville, MD, USA). Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υγρό RPMI 1640 με περιεκτικότητα 20% σε FCS. Η σειρά καλλιεργήθηκε στους 37°C και σε συνθήκες κορεσμού σε υγρασία και 5% περιεκτικότητα σε CO₂. Η τελική περιεκτικότητα σε κύτταρα προσδιορίστηκε με μετρητή Coulter Counter (εταιρεία Γερολυμάτος ΑΕ) σε 2x10⁶ ανά φλάσκα. Σε ορισμένες περιπτώσεις προστέθηκε στο διάλυμα της κυτταροκαλλιέργειας ανασυνδυασμένη Ιντερφερόνη γ.

2. Επιλογή βακτηριακών στελεχών

Τα στελέχη *Επ* που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των δειγμάτων ήσαν του τύπου LC-11 (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) και καλλιεργήθηκαν σε 10 ml brucella broth (GIBCO, USA) με 10% FCS, παρουσία 10 mg/l βανκομυκίνης και 5 mg/l τριμεθοπρίμης. Το καλλιέργημα επώασθη ολονύκτια σε θερμοκρασία 37°C και σε συνθήκες 10% CO₂, 5% O₂ και 85% N₂. Η τελική επιθυμητή συγκέντρωση των βακτηριδίων προσδιορίστηκε επίσης σε 2x10⁸/ml. Η κινητικότητα των μικροοργανισμών ελέγχθηκε με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.

3. Διαδικασία επαγωγής κυτταροκινών

Για τον προσδιορισμό της επαγωγής των κυτταροκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα μετά την επιμόλυνση από *Επ*, μονοσιβάδες επιθηλιακών κυττάρων μολύνθηκαν με 2x10⁸ βακτηρίδια/ml PBS σε δύο διαφορετικές φάσεις: *Φάση 1*, επιμόλυνση με ζωντανά μικρόβια και *Φάση 2*, επιμόλυνση με ίδιο αριθμό βακτηριδίων τα οποία όμως είχαν επεξεργαστεί με διάλυμα φορμόλης 0,5% και ως εκ τούτου είχαν νεκρωθεί. Η επώαση των δειγμάτων έγινε στους 37°C για 48 ώρες το μέγιστο (η πλειονότητα των πειραμάτων περιελάμβανε 3ωρες επώασεις). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακές καλλιέργειες χωρίς επιμόλυνση, εναιώρημα θρεπτικού υγρού χωρίς βακτηρίδια καθώς και χορήγηση καθαρού διαλύματος PBS.

4. Ανάλυση του mRNA της IL-8 με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Αφού απομονώθηκε ολικό RNA από τα κύτταρα ΚΑΤΟ III με τη χρήση του

κιτ εξαγωγής RNA-zol (Biotecx Laboratories Inc., TX, USA), ακολούθησε έλεγχος σε φωτομετρημένα δείγματα (260 nm) και δημιουργήθηκε σειρά συγκεντρώσεων mRNA σε κλίμακες από 1 έως 0,001 µg/ml, αντιστροφή μεταγραφή και παραγωγή του c-DNA και τέλος αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση της IL-8, βάσει γνωστών θερμοδυναμικών πρωτοκόλλων.⁶ Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το κιτ RT-PCR της εταιρείας Hofmann - LaRoche χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (primers) ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GTC και T CTC AGC CCT CTT CAA AAA CTT CTC αντίστοιχα. Σε κάθε πείραμα περιελήφθηκε θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε αгарόζη περιεκτικότητας 1,5%, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υβριδισμός με ανιχνευτή IL-8 σεσημασμένο με ³²P. Η πυκνότητα των μπαντών που προέκυψαν μετρήθηκε με σύστημα ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

5. Ανοσοϊστοχημική διερεύνηση έκφρασης ICAM-1

Για τον έλεγχο της έκφρασης του λευκοκυτταρικού μορίου προσκόλλησης ICAM-1 χρησιμοποιήθηκε η ανοσοϊστοχημική τεχνική APAAP. Κύτταρα KATO III που αναπτύχθηκαν σε confluence 80%, μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορμαδεΰδη για 10 λεπτά. Μετά από δεύτερη μονιμοποίηση σε 1:1 απόλυτη μεθανόλη και 3% H₂O₂, τα κύτταρα επλύθηκαν με PBS και επωάσθηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του ICAM-1 σε αραιώση 1:500 (Εταιρεία Novocastra, UK). Η τελική χρώση έγινε με Εθυλοαμινοκαρβαζόλη (AEC).

Αποτελέσματα και συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα από το παραπάνω πείραμα δείχνουν σημαντικά αυξημένη παραγωγή mRNA IL-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα KATO III, με μεγαλύτερη αύξηση της έκκρισης 3 ώρες μετά από την επιμόλυνση. Παράλληλα, παρατηρήθηκε και επαγωγή της έκφρασης του μορίου προσκόλλησης ICAM-1, ένδειξη του ότι τα κύτταρα αυτά ρυθμίζουν απευθείας την τοπική φλεγμονώδη αντίδραση η οποία προκαλείται προφανώς από την παρουσία *Επ*.

Οι μέχρι σήμερα μελέτες με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχνουν ότι τα Ελικοβακτηρίδια του πυλωρού επικολλούνται αλλά δεν διηθούν το γαστρικό επιθήλιο καθώς και το υποκείμενο χόριο.⁷ Αν και ο αιτιοπαθογενετικός μηχανισμός δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, υπάρχουν ενδείξεις ότι φλεγμονή μπορεί να δημιουργηθεί είτε από αυτό καθ' αυτό το μικρόβιο είτε από αλληλεπιδράσεις του με το επιθηλιακό στοιχείο. Προηγούμενες εργασίες δείχνουν ότι το *Επ* εκκρίνει ή υποβοηθά την έκκριση παραγόντων που προσελ-

κύουν ή επάγουν ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, λευκοκύτταρα, τα οποία είναι τα κύρια φλεγμονώδη στοιχεία της χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί αύξηση της έκκρισης IL-8 στο γαστρικό βλεννογόνο ασθενών που έχουν μολυνθεί με *Επ*.² Σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις, τα ευρήματα από το παραπάνω πείραμα που διενεργήσαμε καταδεικνύουν ότι η παραγωγή mRNA IL-8 από καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων μολυσμένων με *Επ* είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες ενώ παράλληλα επιτείνεται και η έκφραση του ICAM-1, μορίου που θεωρείται ως βασικός παράγοντας προσκόλλησης και συνάθροισης των λευκοκυττάρων.

Πολλοί τύποι κυττάρων θεωρούνται ικανοί να παράγουν IL-8, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, ουρογεννητικού και γαστρεντερικού σωλήνα.⁸ Πρόσφατες εργασίες εξ άλλου επιβεβαιώνουν την παραγωγή IL-8 από επιθηλιακά κύτταρα μετά την επιμόλυνσή τους με διάφορα είδη μικροβίων. Παράλληλα πιθανολογείται ότι εκτός της IL-8 και άλλες κυτταροκίνες ενεργοποιούνται μετά από μόλυνση επιθηλιακών κυττάρων τόσο με *Επ* όσον και με άλλους μικροοργανισμούς. Η IL-8 όπως είναι γνωστό αποτελεί μέλος ομάδας προφλεγμονωδών μορίων που ανήκουν στην οικογένεια των «χυμοκινών», η έκκριση των οποίων συνδυάζεται με χημειοταξία των T λεμφοκυττάρων, ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων και διέγερση των αντιστοιχών μορίων προσκόλλησης.⁹ Η φύση (προέλευση?) των επιθηλιακών κυττάρων τα οποία αλληλεπιδρούν με το *Επ* φαίνεται επίσης ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκκριση της IL-8. Αν και η κυτταρική σειρά KATO III η οποία χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή φέρει τον υποδοχέα της Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, επιμόλυνση κυττάρων τύπου Caco-2 και T84 που φέρουν επίσης τον ίδιο υποδοχέα δεν φαίνεται ότι αυξάνουν τα επίπεδα της IL-8. Φαίνεται λοιπόν ότι εκτός του παραπάνω υποδοχέα και άλλα μόρια συμμετέχουν στη μεταγωγή σημάτων μεταξύ κυτταρικής σειράς KATO III και Ελικοβακτηριδίου, τα οποία είναι απαραίτητα για την έκκριση της IL-8. Υπάρχουν εργασίες που τεκμηριώνουν την παραγωγή IL-8 από επιθηλιακές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης μετά από επιμόλυνση με *E. coli*¹⁰ καθώς επίσης και δεδομένα που δείχνουν την υπερέκκριση σημαντικών ποσοτήτων IL-8 mRNA από κύτταρα αναπνευστικού επιθηλίου μετά από επιμόλυνση με *Pseudomonas Aeruginosa*. Αν και για την παθογενετική δράση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού έχουν ενοχοποιηθεί μόρια όπως λιποσακχαρίτες, ένζυμα, και τοξίνες μεταξύ των οποίων και η *κενοτοπιώδης τοξίνη*, φαίνεται ότι για την έκκριση της IL-8 απαιτείται και κάποιο άλλο μόριο αφού στελέχη μονιμοποιημένα με φορμόλη δεν ήσαν ικανά κατά τη διενέργεια των πειραμάτων μας να επιφέρουν αύξηση του mRNA.

Το μόριο ICAM-1 (CD54) - η παρουσία του οποίου καταδείχθηκε με ανοσοϊστοχημική τεχνική σε κύτταρα μολυσμένα με *Επ* - θεωρείται απαραίτητο για τη συνάθροιση των λευκοκυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η χρόνια ενεργός γαστρίτιδα.¹¹ Το ICAM-1 εκφράζεται από επιθηλιακά κύτταρα, από ενδοθηλιακά κύτταρα και από κύτταρα που παρουσιάζουν το αντιγόνο. Έχει αναφερθεί θετική ρύθμιση έκφρασης ICAM-1 μετά από διέγερση των κυττάρων με IFN- γ , TNF- α και IL-1.¹² Αν και η επιμόλυνση των κυττάρων ΚΑΤΟ III από Ελικοβακτηρίδιο προκαλεί μικρή μόνο αύξηση του ICAM-1, η παράλληλη αύξηση κυτταροκινών όπως ο TNF- α φαίνεται ότι επάγει την έκκριση του μορίου αυτού και συμβάλει στην καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων λόγω της προκαλούμενης συνάθροισης οξέων φλεγμονωδών στοιχείων.¹³

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N Engl J Med 1991;324:1043-8.
2. Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JJ, Stachl, Lindley IJD. Gastric interleukin 8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. Scand J Immunol 1993;37:65-70.
3. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S. Tumor necrosis factor α and interferon γ synergistically induce interleukin-8 production in human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NK-kappaB-loke binding sites of the interleukin 8 gene. J Biol Chem 1992;267:22506-11.
4. Valnes K, Brandtzaeg P, Elgjo K, Stave R. Specific and nonspecific humoral defence factors in the epithelium of normal and inflamed gastric mucosa. Gastroenterology 1984;86:402-12.
5. Brandtzaeg P, Valnes K, Scott H, Rognum T, Berkje K. The human gastrointestinal secretory immune system in health and disease. In: Polak JM, Bloom SR, Wright NA, Butler AG eds. Basic science in gastroenterology: diseases of the gut. Norwich, England, p. 179-200, 1986.
6. Crowe S, Alvarez L, Dytoc M, Hunt R, Muller M, Ernst P. Expression of Interleukin-8 and CD54 by Human Gastric Epithelium after *Helicobacter pylori* infection in Vitro. Gastroenterology 1995;108:65-74.
7. Sherman P. Adherence and internalization of *H. pylori* by epithelial cells. In: Hunt R, Tytgat GNJ eds. *H. pylori*-Basic mechanisms to clinical cure. Boston: Kluwer Academic, 148-162, 1994.
8. Eckmann L, Kagnoff M, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. Infect Immun 1993;61:4569-74.
9. Sherry B, Cerami A. Small cytokine superfamily. Curr Opin Immunol 1991;3:56-60.
10. Svanborg C, Agace W, Hedges S, Linder H, Svensson M. Bacterial adherence and epithelial cell cytokine production. Zbl Bakt 1993;278:359-64.

11. Yoshida N, Granger D, Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Kviety P. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori* induced inflammation. *Gastroenterology* 1993;105:1432-40.
12. Kaiserlian D, Rigal D, Abello J, Revillard J. Expression, function and regulation of the intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal cell lines. *Eur J Immunol* 1991;21:2415-21.
13. Crabtree J, Shallcross T, Heatley R, Wyatt J. Mucosal tumour necrosis factor α and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991;32:1473-7.