

## Znaczenie *Helicobacter pylori* w rozwoju chłoniaka MALT — indukcja proliferacji i supresji immunologicznej

Paweł Krzyżek<sup>1</sup>, Barbara Kwiatkowska<sup>2</sup>

Chłoniaki strefy brzeżnej należą do indolentnych, wolno rosnących chłoniaków, wywodzących się z dojrzałych limfocytów B. Reprezentują blisko 8% wszystkich chłoniaków i około 50% pierwotnych chłoniaków żołądka (GML — *gastric MALT lymphoma*). Na podstawie licznych badań epidemiologicznych i mikrobiologicznych wykazano, że *Helicobacter pylori* jest zdolny do inicjowania i indukowania progresji GML. Fizjologicznie tkanka limfatyczna nie jest obecna w żołądku, natomiast podczas długotrwałej kolonizacji tego organu przez *H. pylori* i infiltracji komórek odpornościowych może dojść do powstania GML. W pracy tej opisano mechanizmy, które przyczyniają się do rozwoju zależnego od *H. pylori* GML. Zaproponowano także obecność potencjalnych miejsc docelowych, mogących zwiększyć skuteczność remisji chłoniaków zlokalizowanych w obrębie żołądka.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2017; 2, 4: 332–338

**Słowa kluczowe:** chłoniak typu MALT, żołądek, *Helicobacter pylori*, proliferacja, immunosupresja

### Wprowadzenie

*Helicobacter pylori* jest spiralną, Gram-ujemną pałeczką zdolną do kolonizowania śluzówki żołądka. Proces ten ma miejsce najczęściej w dzieciństwie i utrzymuje się przez całe życie przy braku odpowiedniej terapii eradykacyjnej [1]. Nie u wszystkich osób skolonizowanych tą bakterią dochodzi do manifestacji objawów chorobowych, natomiast stan ten w istotny sposób predysponuje do ich rozwoju [2]. Określa się, że ponad 90% przewlekłych zapaleń błony śluzowej żołądka jest rezultatem długotrwałej infekcji *H. pylori*. Do innych przyczyn zalicza się niesteroidowe leki przeciwzapalne, spożywanie alkoholu, refluks dwunastniczo-żółciowy oraz zanikowe zapalenie śluzówki o podłożu autoimmunologicznym. Pacjenci z zapaleniem śluzówki żołądka zgłaszają dolegliwości ze strony układu żołądkowo-jelitowego, wśród których dominują dyspepsja, wzdęcia, dyskomfort oraz uczucie pełności w nadbrzuszu. Do nasilenia objawów może dojść po spożyciu

ciężkostrawnych posiłków, alkoholu oraz w wyniku stresu emocjonalnego i przemęczenia [3]. Ostra faza infekcji *H. pylori* związana jest z intensywnym stanem zapalnym śluzówki żołądka, charakteryzującym się infiltracją komórek układu odpornościowego, zwłaszcza neutrofilów. Konsekwencją jest wzmożone wytwarzanie cytokin prozapalnych uczestniczących w degradacji tkanki żołądka, w tym IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , CCL2-5, CCL20 oraz CXCL1-3 [4]. Mediatorzy zapalenia przyczyniają się do uszkodzeń epitelium, zmian w procesach proliferacji i apoptozy, a także modulowania ekspresji genów gospodarza [2]. Następstwem ostrej fazy zakażenia jest obniżenie odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej ze strony organizmu gospodarza i przejście infekcji *H. pylori* w stan chroniczny. U niektórych osób może rozwinąć się choroba wrzodowa żołądka i/lub dwunastnicy, nowotwór żołądka lub chłoniak typu MALT (*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*) [1].

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia Tętniczego i Onkologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

#### Artykuł w wersji pierwotnej:

Krzyżek P, Kwiatkowska B. The importance of *Helicobacter pylori* in the development of gastric MALT lymphoma — induction of proliferation and immune suppression. *NOWOTWORY J Oncol* 2017; 67: 261–266.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Charakterystyka chłoniaków MALT żołądka

Chłoniaki MALT mogą rozwinąć się praktycznie w każdym organie człowieka, np. w płucach, piersiach, tarczycy, pęcherzu moczowym lub skórze [5]. Przewód pokarmowy również jest predysponowany do pojawienia się tego typu zmian nowotworowych, zaś chłoniak MALT żołądka (GML — *gastric MALT lymphoma*) jest jednym z najczęściej powstających w układzie trawiennym [6]. GML należy do indolentnych, rozwijających się w lokalizacji pozawęzłowej, chłoniaków strefy brzeżnej (*marginal zone lymphoma*). Pierwotne chłoniaki przewodu pokarmowego, w tym żołądka, charakteryzują się powolnym, długoletnim przebiegiem oraz miejscowym wzrostem, ograniczonym do ściany przewodu pokarmowego. Prawdopodobieństwo zachorowania wzrasta wraz z wiekiem. Do rozpoznania dochodzi przeważnie około 60 roku życia, z podobną częstością w przypadku kobiet i mężczyzn [7]. Chłoniaki strefy brzeżnej mają charakter nieziarniczny i wywodzą się z dojrzałych obwodowych limfocytów B [8]. W fizjologicznych warunkach żołądek pozbawiony jest tkanki limfatycznej, jednak w przebiegu infekcji *H. pylori* i zależnej od tego procesu infiltracji komórek odpornościowych może dojść do rozwoju MALT w obrębie tego organu [9]. Komórki chłoniaka charakteryzuje obecność określonych, wspólnych cech immunofenotypowych: CD20<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, CD35<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup> oraz IgD<sup>-</sup> [10]. Chłoniaki MALT żołądka klasyfikuje się jako rzadkie zaburzenia limfoproliferacyjne, ponieważ częstość zachorowań na GML wynosi 1–1,5/100 000 rocznie. Dla porównania: rak żołądka rozpoznawany jest od 5 do 10 razy częściej (dane z National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results) [11].

Rozpoznanie pierwotnego chłoniaka żołądka typu MALT ustala się na podstawie objawów klinicznych, wyniku badania histopatologicznego oraz immunohistochemicznego [11, 12]. Dodatkowo badania powinny być poprzedzone wywiadem klinicznym, w którym pacjenci zgłaszają najczęściej dolegliwości, tj. dyskomfort w nadbrzuszu, bóle brzucha, nudności, wymioty, utrata masy ciała, sporadycznie występujące krwawienie z przewodu pokarmowego. Złotym standardem diagnostyki GML jest gastroscopia z pobraniem licznych wycinków błony śluzowej żołądka [7, 8]. W badaniu endoskopowym górnego odcinka przewodu pokarmowego stwierdza się pogrubiałe i nieregularne fałdy błony śluzowej żołądka z licznymi nadżerkami i owrzodzeniami. Obraz endoskopowy jest niecharakterystyczny i może stwarzać trudności diagnostyczne, dlatego też w trakcie badania należy pobrać liczne wycinki do oceny histopatologicznej. Dodatkowo wykonywane są badania immunofenotypowe i badania molekularne [8, 12].

W celu oceny stopnia zaawansowania chłoniaków ziar niczych i nieziarnicznych powszechnie stosuje się skalę Ann Arbor, jednak z uwagi na jej pewne ograniczenia w ocenie zaawansowania chłoniaków pierwotnie wywodzących się z przewodu pokarmowego, w ich przypadku preferowana

jest klasyfikacja z Lugano i wg Radaszkiewicza [11]. Dla szczególnie dokładnej oceny pierwotnych chłoniaków przewodu pokarmowego, europejska grupa badawcza zajmująca się chłoniakami przewodu pokarmowego (European Gastrointestinal Lymphoma Study Group) opracowała specjalną modyfikację powszechnie używanej w onkologii skali TNM (*tumor–node–metastasis*), którą nazwano *The Paris System* [13]. Na podstawie badań molekularnych można zdiagnozować zmiany w materiale genetycznym charakterystyczne dla komórek chłoniaka (translokacje, mutacje punktowe, delecje i amplifikacje genów). Ich określenie ma istotne znaczenie w dalszej diagnostyce i planowanej terapii [11]. Charakterystyczne dla chłoniaka MALT żołądka zmiany genetyczne — translokacje t(1;14)(p22;q32) i t(11;18)(q21;q21) — są odpowiedzialne za nieefektywną reakcję na sygnały proapoptotyczne oraz zwiększoną aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Wśród innych, rzadszych translokacji, których znaczenie nie zostało jeszcze dokładnie określone, wymienia się t(14;18)(q32;q21) i t(3;14)(p14.1;q32) [12]. Translokacja t(11;18) jest najczęstszą aberracją chromosomalną, dotyczącą około 20% chorych z rozpoznaniem chłoniaka typu MALT. Szczególnie często występuje w przypadku chłoniaków zlokalizowanych w żołądku, jelicie grubym i płucach [5].

## Ekspresja czynników wirulencji *H. pylori* a rozwój GML

Na podstawie licznych badań epidemiologicznych i mikrobiologicznych udowodniono udział *H. pylori* w inicjacji i progresji GML [5, 6]. W badaniach 110 pacjentów chorych na GML u 101 (92%) wykryto obecność tego patogenu [14]. Uważa się, że szczepy *H. pylori* produkujące wiele czynników wirulencji są związane z zaostreniem zapalenia śluzówki żołądka. Korelacje między ekspresją czynników zjadliwości, zwłaszcza onkoproteiny CagA i toksyny VacA, są relatywnie dobrze udokumentowane w przebiegu choroby wrzodowej i raka żołądka, wciąż natomiast wiele kontrowersji wzbudza ich udział w rozwoju chłoniaka MALT żołądka [6].

Wyspa patogenności *cagPAI* stanowi 40 kb fragment DNA, zawierający 27 do 31 genów. Osiemnaście z nich koduje informacje o białkach tworzących IV system sekrecji (T4SS), który warunkuje translokację onkoproteiny CagA i składowych peptydoglikanu ściany komórkowej [2]. CagA jest 120–145 kDa proteiną, produkowaną przez 60–70% szczepów *H. pylori*. Przyczynia się do reorganizacji szkieletu aktywnego komórek gospodarza, zaburzenia połączeń ścisłych oraz zmian morfologicznych komórek eukariotycznych, tj. fenotypu kolibra [4]. Co więcej, CagA wpływa na zahamowanie akumulacji regulatora apoptozy i supresora nowotworzenia — p53, to zaś umożliwia limfocytom B uniknięcie programowanej śmierci oraz akumulację mutacji genetycznych [15].

Istnieją dwie ścieżki modulowania przez CagA szlakami przekaźnictwa komórek eukariotycznych, na drodze zależnej i niezależnej od fosforylacji. Pierwsza z nich polega na przyłączeniu reszty fosforanowej w obrębie motywu EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) białka CagA. Tak zmodyfikowana proteina przyłącza się do fosfatazy tyrozynowej (SHP-2 — *protein tyrosine phosphatase 2*), a ta aktywuje kinazy regulowane zewnątrzkomórkowymi sygnałami 1 i 2 (Erk1/2 — *extracellular signal-regulated kinases 1/2*). Nieufosforylowane białko CagA indukuje kinazy Erk1/2 poprzez alternatywną ścieżkę zależną od przekaźnictwa Ras-Raf [2, 16]. Oba procesy przyczyniają się do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i zależnej od niego zwiększonej ekspresji IL-8 [17]. Co więcej, dla fragmentów peptydoglikanu przenoszonych przez T4SS do komórek gospodarza również wykazano zdolność do aktywacji NF- $\kappa$ B i wzrostu sekrecji IL-8 przez indukcję białek Nod1 (*nucleotide-binding oligomerization domain 1*) [18]. IL-8, prócz zdolności chemoatraktancji leukocytów, pełni również istotną rolę jako czynnik mitogeny i angiogeny w progresji nowotworowej [19]. Stymulacja Erk1/2 oraz blokowanie ekspresji p53 wpływa na zahamowanie apoptozy oraz akumulację genetycznie dysfunkcyjnych komórek. Może to przyczynić się do zaburzenia homeostazy między procesami programowej śmierci i proliferacji oraz warunkowanym *H. pylori* rozwojem chłoniaków MALT żołądka [16]. W doświadczeniu Ohnishi i wsp. stworzono transgeniczne myszy, produkujące endogennie białko CagA. U osobników takich po 72 tygodniach od transfekcji zaobserwowano hiperplazję epitelium żołądka, a u części z nich również obecność polipów i gruczolakoraków tego organu. Wykazano, że zmiany te determinowane były nadreaktywnością fosfatazy SHP-2 i kinaz Erk1/2 [20].

W wielu badaniach epidemiologicznych podejmuje się próby nad określeniem korelacji między produkcją CagA przez *H. pylori* a występowaniem chłoniaków MALT żołądka. Eck i wsp. w analizie seroprewalencji względem CagA u pacjentów zainfekowanych *H. pylori*, wynik pozytywny otrzymali u 95,5% (64/67) osób chorych na GML i u 67% (33/49) grupy kontrolnej z przewlekłym zapaleniem śluzówki żołądka [21]. Sumida i wsp. uzyskali identyczną częstość występowania przeciwciał anti-CagA, tj. 95,5% (42/44). Dodatkowo stwierdzono, że u osób z remisją GML (86,4%; 38/44) poziom przeciwciał skierowanych przeciw *H. pylori* i proteinie CagA był znamienne wyższy niż w grupie bez uzyskanego efektu terapeutycznego, odpowiednio:  $105,2 \pm 166,4$  i  $24,3 \pm 14,9$  U/ml oraz  $43,7 \pm 25,1$  i  $16,5 \pm 13,2$  U/ml [22]. W badaniach Delchiera i wsp. pacjentów zróżnicowano – ze względu na stopień progresji choroby – na niezawansowane LGLM (*low-grade GML*) oraz chłoniaki rozlane z dużych limfocytów B (DLBCL — *diffuse large B-cell lymphoma*). W pierwszej grupie badanych obecność przeciwciał przeciw CagA wykryto u 44,8% (13/29), natomiast wyższą seroprewalencję stwierdzono u osób z DLBCL, tj. 75% (12/16) [23].

Podobnych obserwacji dokonali Peng i wsp., którzy określali obecność genu *cagA* przez izolację DNA z biopłatów pacjentów. Częstość występowania tego genu wykazano kolejno u 30,3% (17/56) osób z zapaleniem śluzówki żołądka, 37,8% (14/37) pacjentów z LGML i 76,7% (23/30) z DLBCL [24]. Wyniki te sugerują, że stopień zaawansowania i progresja chłoniaków MALT żołądka mogą być zależne od ekspresji *cagA* przez szczepy *H. pylori*. Hipotezę tę potwierdzają pośrednio efekty leczenia GML u pacjentów Hp<sup>+</sup> CagA<sup>+</sup>. Remisja choroby przez terapię eradykacyjną *H. pylori* u osób, u których wykryto obecność CagA przebiegała szybciej (średnio 3 miesiące) niż u pacjentów zainfekowanych szczepami *H. pylori* CagA<sup>-</sup> (6,5 miesiąca) [25].

Drugim najważniejszym czynnikiem wirulencji produkowanym przez *H. pylori* jest toksyna VacA. Wszystkie szczepy tej bakterii posiadają gen *vacA*, natomiast w warunkach *in vitro* jedynie połowa syntetyzuje toksynę VacA [6]. W sekwencji *vacA* obecne są trzy regiony zmienne, tj. sekwencja sygnałowa s (s1a, s1b, s1c, s2), część środkowa m (m1, m2a, m2b) oraz region pośredni i (i1, i2, i3). Warianty s1/m1/i1 cechuje wyższa aktywność biologiczna i silniejszy efekt toksyczny [26]. VacA jest wysoce immunogenną 95 kDa proteiną, wywołującą szereg zmian patologicznych w komórkach docelowych organizmu gospodarza. Wśród nich możliwość interferencji z budową cytoszkieletu oraz indukcja apoptozy przez uwolnienie cytochromu c z mitochondriów i zdolność do formowania anionoselektywnych porów w błonach komórek [2, 4]. Dodatkowo VacA posiada w warunkach *in vivo* aktywność antyproliferacyjną względem limfocytów i możliwość modulowania procesami układu odpornościowego [6]. W badaniach Koehler i wsp. izolowano DNA z biopłatów pacjentów zainfekowanych *H. pylori* z zapaleniem błony śluzowej, nowotworem i chłoniakiem MALT żołądka. Oceniono, że w przebiegu raka żołądka dominującym genotypem *H. pylori* był *vacAs1m1* (allel s1 wykryto u 93%; 26/28, zaś m1 u 61%; 17/28). U osób chorych na GML dominował wariant *vacAs1m2* (allel s1 wykryto u 83%; 20/24, zaś m2 u 83%; 20/24) [27]. Region centralny m wpływa na zdolność toksyny do łączenia się z komórką docelową [26]. Wariant *vacAm2* skutkuje redukcją aktywności tej cytotoksyny [6]. Z tego powodu wnioskuje się, że obecność mniej aktywnych form antyproliferacyjnej toksyny VacA u szczepów *H. pylori* może przyczynić się do rozwoju chłoniaków MALT żołądka.

### **Modulowanie odpowiedzi układu odpornościowego przez *H. pylori***

Przewlekły stan zapalny śluzówki żołądka (*gastritis*) warunkowany infekcją *H. pylori* jest prawdopodobnie kluczowy dla rozwoju chłoniaków MALT żołądka. Proces zapalny, toczący się w obrębie błony śluzowej, przyczynia się do wzmożonej prezentacji antygenów i rekrutacji limfocytów B [28]. Infiltracji tych komórek odpornościowych towarzyszy aktywacja procesów proliferacyjnych, powstanie

skupisk limfocytów B oraz grudek chłonnych (GC, *germinal centers*) [12, 16]. Co więcej, niewłaściwa aktywacja ścieżki przekaźnictwa NF- $\kappa$ B inicjuje transformację tkanki limfocytycznej żołądka [12]. Czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B nadzoruje dojrzewanie i zdolności przetrwania limfocytów B i T, a także wywiera antyapoptotyczny efekt względem tych komórek [29]. *H. pylori*, poprzez translokację CagA i fragmentów peptydoglikanu, determinuje podwyższoną aktywność NF- $\kappa$ B, czego konsekwencją jest zaburzenie odpowiedzi odpornościowej organizmu gospodarza, hiperproliferaacja limfocytów oraz potencjalna indukcja GML [2, 17, 18]. Na tej podstawie stwierdza się, że przewlekła lub powtarzająca się aktywacja układu immunologicznego przez *H. pylori* może prowadzić do rozrostu tkanki limfoidalnej, co przy obecności czynników środowiskowych i odpowiedniej predyspozycji genetycznej może skutkować rozwojem procesu karcynogenego [2, 8]. Pomimo możliwości aktywacji limfocytów B przez antygeny *H. pylori* i zależnej od tego procesu autostymulacji, limfogeneza warunkowana jest również stymulacją limfocytami T [6, 12].

Główną część limfocytów w organizmie gospodarza, indukowanych obecnością *H. pylori*, stanowią limfocyty pomocnicze Th<sub>1</sub> oraz Th<sub>17</sub>. Pierwsze z nich wydzielają cytokiny prozapalne IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , te z kolei aktywują makrofagi do aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Limfocyty Th<sub>17</sub> również przyczyniają się do progresji stanu zapalnego poprzez sekrecję mediatorów zapalenia, w tym IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22 [4]. Proces ten jest charakterystyczny dla początkowych stadiów infekcji *H. pylori*. Późniejszy etap polega na wyciszeniu nadmiernej odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza przez aktywację procesów zależnych od limfocytów regulatorowych CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Treg) [9, 30, 31]. Rekrutacja limfocytów Treg odbywa się wskutek wydzielania chemokin CCL17 i CCL22, których źródłem są między innymi limfocyty B [32]. Funkcja limfocytów Treg bazuje na promowaniu sygnałów tolerogennych i wydzielaniu cytokin przeciwzapalnych IL-10 i TGF- $\beta$  [9, 30]. IL-10 zwiększa zdolności do proliferacji, przetrwania i różnicowania limfocytów B. Z drugiej strony mediatory te posiadają również antyproliferacyjne i supresyjne działanie względem innych niż limfocyty Treg komórek odpornościowych, tj. redukują wydzielanie prozapalnych IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  przez limfocyty Th<sub>1</sub> i IL-17 przez Th<sub>17</sub>. Taka aktywność sprzyja procesowi karcynogenezy przez inhibicję sekrecji substancji antynowotworowych [33]. TGF- $\beta$  jest cytokiną wpływającą na represję genów kodujących mediatory cytotoksyczności, w tym perforyn, granzymów A i B oraz IFN- $\gamma$ , jak również hamującą nadmierną proliferację [34]. Supresyjne środowisko o wysokim stężeniu TGF- $\beta$  pełni rolę ochronną przed rozwojem nowotworów. Dzieje się tak do czasu, gdy komórki karcynogenne staną się odporne na działanie bodźców inicjowanych tym mediatorem, np. poprzez zwiększoną aktywność szlaku sygnałowego mTOR (*mammalian target*

*ofrapamycin*), warunkującą niewrażliwość na antyproliferacyjne działanie TGF- $\beta$  [35]. Wtedy też podwyższony poziom TGF- $\beta$  jest korzystny dla rozwoju chłoniaków, ponieważ przyczynia się do zaburzenia aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej względem zmienionych nowotworowo komórek [33]. W badaniach *in vivo* na modelu mysim Craig i wsp. wykazali zdolność *Helicobacter* spp. do inicjowania rozwoju chłoniaków MALT na drodze aktywacji limfocytów Treg. U myszy BALB/c infekowanych *H. felis* usunięcie limfocytów CD4<sup>+</sup> lub CD25<sup>+</sup> przy pomocy przeciwciał monoklonalnych skutkowało regresją procesu nowotworowego. Po 18 miesiącach od zakażenia gryzoni żołądki zainfekowanych osobników poddano analizie i stwierdzono obecność 2–15 guzków nowotworowych u każdego z nich. Odmianą sytuację zaobserwowano u myszy pozbawionych limfocytów CD4<sup>+</sup>, ponieważ u żadnej z nich nie dostrzeżono zmian nowotworowych. U myszy bez limfocytów CD25<sup>+</sup> uzyskano podobne rezultaty, za wyjątkiem jednego osobnika z pojedynczym guzkiem [32]. Wyniki te sugerują, że limfocyty Treg mogą w aktywny sposób przyczyniać się do rozwoju onkogenezy poprzez promowanie supresyjnego środowiska, obniżającego aktywność przeciwnowotworową układu odpornościowego.

Bakterie *H. pylori*, prócz zdolności do rekrutacji limfocytów Treg, mogą uczestniczyć w wyciszeniu nadmiernej odpowiedzi prozapalnej wskutek promowania wysokich stężeń czynników B7/H1. Częściczki te wykazują homologię względem immunoglobulin i wywierają hamujący wpływ na receptory programowanej śmierci-1 (PD-1) na powierzchni limfocytów T. W doświadczeniu na komórkach nowotworowych wykazano, że B7/H1 przyczyniają się do oporności komórek karcynogennych na apoptozę indukowaną przez receptory śmierci Fas [36]. Zależna od *H. pylori* zwiększona ekspresja B7/H1 determinuje także transformację dziewiczych limfocytów T w limfocyty Treg [37]. Wyniki badań Liny i wsp. ukazują, że *H. pylori* wpływa na wzrost stężenia czynników B7/H1. Było to zależne od translokacji CagA i fragmentów peptydoglikanu do komórek gospodarza. W warunkach *in vivo* na myszach C57BL/6 weryfikowano efekt infekcji dwoma szczepami *H. pylori*, tj. PMSS1 — produkującym system T4SS, oraz SS1 — nieposiadającym funkcjonalnego T4SS, na stężenie tych immunoglobulin. Efekt promujący wzrost poziomu B7/H1 dostrzeżono jedynie dla szczepu PPSS1, co skutkowało z kolei wzmożonym namnażaniem bakterii w organizmie myszy, wzrostem ilości limfocytów Treg oraz IL-10 w osoczu [38].

### **Leczenie chorych na chłoniaki MALT żołądka**

Chłoniaki MALT charakteryzują się łagodnym przebiegiem. Rozpoznawane są przeważnie w początkowym stadium choroby. W przypadku pierwotnego chłoniaka żołądka typu MALT postępowanie lecznicze jest uzależnione od potwierdzenia aktywnego zakażenia *H. pylori* oraz obecności



translokacji t(11;18), która wiąże się z mniejszą skutecznością terapii [8]. Infekcje tym patogenem mogą w istotny sposób przyczynić się limfoproliferacji oraz do rozwoju GML. Z tego powodu zakażenie *H. pylori* powinno być potwierdzone u każdego pacjenta ze zdiagnozowanym chłoniakiem żołądka. Badania obejmują ilościowe oznaczenie przeciwciał IgG, IgM i IgA, wykrywanie antygenów *H. pylori* w kale, metody hodowlane, histochemiczne i testy oddechowe [39]. Terapia eradykacyjna powinna przebiegać z użyciem wysoce efektywnych antybiotyków, z uwzględnieniem biocydów, na które szczepy *H. pylori* są wrażliwe [5]. Oporność na klarytromycynę w krajach europejskich przekracza 20%, stąd też schematem zastępczym wobec standardowej potrójnej terapii (klarytromycyna, amoksycylina, inhibitor pompy protonowej) jest tzw. terapia poczwórna z bizmutem (sole bizmutu, metronidazol, tetracyklina, inhibitor pompy protonowej) [40]. Antybiotykoterapia celowana w zakażeniu *H. pylori* skutkuje regresją GML u 77,5–94% pacjentów [16]. Do regresji zmian dochodzi średnio w przeciągu 5–12 miesięcy, natomiast w niektórych przypadkach czas ten może być wydłużony nawet do 45 miesięcy. Po uzyskaniu remisji obowiązuje nadzór kliniczny i endoskopowy z uwzględnieniem badań histopatologicznych i testów w kierunku zakażenia *H. pylori* [7]. U pacjentów, u których udało się uzyskać całkowitą remisję choroby, przeżywalność 10-letnia sięga 100%, a u chorych z częściową remisją zmian — około 80% [7, 41]. Jeśli dojdzie do reinfekcji tego patogenu, GML pojawia się ponownie, a progresję choroby cechuje dynamiczniejszy charakter, warunkowany uwrażliwieniem tkanki żołądka na antygeny *H. pylori* [42]. W przypadku nieskuteczności leczenia farmakologicznego zaleca się radioterapię. Przy agresywnych chłoniakach żołądka, np. DLBCL — chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B, mimo współistniejącej infekcji *H. pylori* nie zaleca się stosowania wyłącznie eradykacji zakażenia, lecz od początku polichemioterapię. W terapii chłoniaków o dużym stopniu zaawansowania oraz u chorych z nawrotem choroby stosuje się najczęściej chlorambucyl, fludarabinę lub rytuksymab [5, 7, 9, 41].

### Praktyczne zastosowanie wiedzy

Procedura potwierdzenia obecności *H. pylori* u pacjentów ze zdiagnozowanym GML jest przeprowadzana rutynowo [39]. Sugeruje się natomiast, że — prócz wykrycia bakterii — ważnym elementem diagnostyki powinno być również określenie profilu wirulencji *H. pylori*. Taka praktyka jest istotna nie tylko z przyczyn epidemiologicznych (np. wyższa częstość wykrywania szczepów VacA<sup>s1</sup>m2), lecz również w planowaniu efektywnej terapii. Dowiedziono, że remisja GML spowodowanego przez szczepy CagA<sup>+</sup> *H. pylori* jest dwukrotnie szybsza niż przy infekcji wywołanej przez szczepy CagA<sup>-</sup> [25]. Z tego względu obecność *cagA* może w przyszłości stanowić bakteryjny marker genetyczny, determinujący szybkość rekonwalescencji pacjentów.

Co więcej, wiedza na temat produkcji toksyn przez *H. pylori* umożliwi włączenie do terapii związków mogących hamować patologiczne zmiany w komórkach eukariotycznych, eksponowanych na działanie toksyn bakteryjnych. Onkoproteina CagA wpływa na rearanżację cytoszkieletu aktywnego, niszczy połączenia ścisłe, indukuje zmiany morfologiczne komórek oraz przyczynia się do procesu nowotworzenia [4]. Zahamowanie kinaz CagA w zainfekowanych przez *H. pylori* komórkach eukariotycznych prowadzi do całkowitego braku fosforylacji onkoproteiny, a przez to redukuje niszczenie tych komórek. Farmakologiczne hamowanie kinaz tyrozynowych, które warunkują fosforylację CagA, może w przyszłości okazać się atrakcyjną opcją leczniczą u pacjentów z zaawansowanym GML lub po nieskutecznej eradykacji *H. pylori* [43]. Kluczowe cząsteczki obecne podczas procesu karcynogenezy, które odpowiedzialne są za regulację cyklu komórkowego, proliferację i apoptozę, mogą stać się specyficznymi miejscami docelowymi terapii nie tylko u pacjentów chorych na GML, lecz także u osób z innymi chorobami limfoproliferacyjnymi [11].

Obserwuje się podwyższony poziom infiltracji limfocytów Treg do zmienionej nowotworowo tkanki żołądka [32]. Z tego powodu, w przebiegu GML, intensywność stanu zapalnego często koreluje odwrotnie proporcjonalnie z zagęszczeniem *H. pylori* w żołądka. Na tej podstawie można fałszywie wysnuć wniosek, że brak silnej reakcji zapalnej w obrębie śluzówki żołądka oznacza początkowe stadium choroby. Wykrycie wysokiego miana bakterii, przy jednoczesnym niskim wskaźniku stanu zapalnego, może wskazywać natomiast na rozwój procesu GML [44]. Apeluje się więc o szczególną czujność onkologiczną podczas diagnozy osób z podejrzeniem chłoniaków żołądka.

Wzrost poziomu limfocytów Treg w śluzówce żołądka jest kluczowym czynnikiem redukującym proliferację i aktywność cytotoksyczną innych subpopulacji limfocytów, niepowodzenia terapeutyczne i złą prognozę diagnostyczną [9, 30, 45, 46]. Badania nad aktywnością limfocytów Treg podczas trwającej infekcji *H. pylori* mogą pomóc w znalezieniu nowych, efektywnych terapii skupiających się na kontroli procesu nowotworzenia. Postępy w immunoterapii nowotworów ukazały, że związki celujące w aktywność limfocytów Treg mogą stać się interesującymi kandydatami w leczeniu opartym o modulację działania układu odpornościowego. Redukcja aktywności limfocytów Treg sprzyja przesunięciu warunków mikrośrodowiska nowotworowego z silnie supresyjnego na fizjologicznie aktywne [45, 46]. Wśród potencjalnych metod umożliwiających uzyskanie tego efektu wymienia się: blokowanie receptorów IL-10 [47]; blokowanie selektyn [48]; hamowanie chemokin odpowiedzialnych za rekrutację limfocytów Treg (CCL17, CCL22, CCL20 lub CXCL13); blokowanie receptorów chemokin produkowanych przez efektorowe limfocyty Treg; inhibicję cząsteczek CTLR-4, których stała ekspresja ma miejsce na powierzchni limfocytów Treg, lub przez egzogenną

suplementację IL-2 (co przyczynia się do redukcji aktywności supresyjnej limfocytów Treg) [46]. W dodatku, oprócz terapii blokujących funkcje limfocytów Treg, podawanie niskich dawek cyklofosfamidę również może okazać się obiecujące. Taka terapia zmniejsza w sposób selektywny ilość szybko proliferujących limfocytów Treg w obrębie tkanki nowotworowej oraz wzmacnia odpowiedź przeciwnowotworową [49].

## Podsumowanie

W wielu badaniach ukazano istnienie silnej zależności między kolonizacją śluzówki żołądka przez *H. pylori* a rozwojem GML. Infekcje *H. pylori* warunkują rekrutację limfocytów Treg, które przyczynią się z kolei do promowania sygnałów tolerogennych i sekrecji przeciwzapalnych cytokin IL-10 i TGF- $\beta$ . W ostatnich latach coraz większa ilość badań wskazuje na kluczową rolę limfocytów Treg w zaburzeniu aktywności cytotosycznej i proapoptotycznej komórek odpornościowych oraz w rozwoju GML. Z tego powodu zmniejszenie aktywności lub nadmiernej rekrutacji limfocytów Treg wydaje się interesującym miejscem docelowym w terapiach przeciwnowotworowych opartych na zwiększaniu podatności zmienionych nowotworowo komórek. Złożoność patogenezy GML sprawia, że leczenie pacjentów z tą chorobą wymaga kompleksowej wiedzy z zakresu onkologii, mikrobiologii i immunologii. W świetle prezentowanych rozważań sugeruje się, że ścisła kooperacja między gastroenterologami, onkologami i mikrobiologami powinna być standardem w postępowaniu leczniczym u chorych na GML.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### Mgr Paweł Krzyżek

Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
ul. Chalubińskiego 4  
50-368 Wrocław  
e-mail: krojcerpawel@gmail.com

Otrzymano: 2 maja 2017 r.

Przyjęto do druku: 10 lipca 2017 r.

### Piśmiennictwo

- Blaser MJ, Atherton JC. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321–333.
- Subhash VV, Ho B. Inflammation and proliferation — a causal event of host response to Helicobacter pylori infection. *Microbiology* 2015; 161: 1150–1160.
- Genta RM, Sonnenberg A. Helicobacter-negative gastritis: a distinct entity unrelated to Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41: 218–226.
- White JA, Winter JR, Robinson K. Differential inflammatory response to Helicobacter pylori infection: etiology and clinical outcomes. *J Inflamm Res* 2015; 8: 137–147.
- Witkowska M, Smolewski P. Helicobacter pylori infection, chronic inflammation, and genomic transformations in gastric MALT lymphoma. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 523170.
- Floch P, Mégraud F, Lehours P. Helicobacter pylori strains and gastric MALT lymphoma. *Toxins* 2017; 9: E132.
- Park JB, Koo JS. Helicobacter pylori infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2751–2759.

- Hu Q, Zhang Y, Zhang X i wsp. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and Helicobacter pylori infection: a review of current diagnosis and management. *Biomark Res* 2016; 4: 15.
- Kuo SH, Cheng AL. Helicobacter pylori and mucosa-associated lymphoid tissue: what's new. *Hematology* 2013; 2013: 109–117.
- Troppan K, Wenzl K, Neumeister P i wsp. Molecular pathogenesis of MALT lymphoma. *Gastroenterol Res Pract* 2015; 2015: 102656.
- Pereira MI, Medeiros JA. Role of Helicobacter pylori in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 684–698.
- Owens SR, Smith LB. Molecular aspects of H. pylori-related MALT lymphoma. *Patholog Res Int* 2011; 2011: 193149.
- Ruskoné-Fourmestraux A, Dragosics B, Morgner A i wsp. Paris staging system for primary gastrointestinal lymphomas. *Gut* 2003; 52: 912–913.
- Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR i wsp. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 1175–1176.
- Umehara S, Higashi H, Ohnishi N i wsp. Effects of Helicobacter pylori CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 2003; 22: 8337–8342.
- Wang HP, Zhu YL, Shao W. Role of Helicobacter pylori virulence factor cytotoxin-associated gene A in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8219–8226.
- Nozawa Y, Nishihara K, Peek RM i wsp. Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by Helicobacter pylori in human gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 21–30.
- Viala J, Chaput C, Boneca IG i wsp. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5: 1166–1174.
- Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 375–391.
- Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S i wsp. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1003–1008.
- Eck M, Schmausser B, Haas R i wsp. MALT-type lymphoma of the stomach is associated with Helicobacter pylori strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* 1997; 112: 1482–1486.
- Sumida T, Kitadai Y, Hiyama T i wsp. Antibodies to Helicobacter pylori and CagA protein are associated with the response to antibacterial therapy in patients with H. pylori-positive API2-MALT1-negative gastric MALT lymphoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 1075–1081.
- Delchier JC, Lamarque D, Levy M i wsp. Helicobacter pylori and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2324–2328.
- Peng H, Ranaldi R, Diss TC i wsp. High frequency of CagA+ Helicobacter pylori infection in high-grade gastric MALT B-cell lymphomas. *J Pathol* 1998; 185: 409–412.
- Kuo SH, Chen LT, Lin CW i wsp. Detection of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma cells: clinical and biological significance. *Blood Cancer J* 2013; 3: e125.
- Jones KR, Jang S, Chang JY i wsp. Polymorphisms in the intermediate region of VacA impact Helicobacter pylori-induced disease development. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 101–110.
- Koehler CI, Mues MB, Dienes HP i wsp. Helicobacter pylori genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol* 2003; 56: 36–42.
- Suarez F, Lortholary O, Hermine O i wsp. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 2006; 107: 3034–3044.
- Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a000182.
- Ai TL, Solomon BD, Hsieh CS. T-cell selection and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2014; 259: 60–74.
- Raghavan S, Suri-Payer E, Holmgren J. Antigen-specific in vitro suppression of murine Helicobacter pylori-reactive immunopathological T cells by CD4CD25 regulatory T cells. *Scand J Immunol* 2004; 60: 82–88.
- Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I i wsp. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in Helicobacter-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia* 2010; 24: 1186–1196.
- Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol* 2015; 34: 36–45.
- Thomas DA, Massagué J. TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005; 8: 369–380.

35. Sebestyén A, Márk Á, Hajdu M i wsp. Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas. *Cytokine* 2015; 73: 219–224.
36. Azuma T, Yao S, Zhu G i wsp. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 2008; 111: 3635–3643.
37. Beswick EJ, Pinchuk IV, Das S et i wsp. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Infect Immun* 2007; 75: 4334–4341.
38. Lina TT, Alzahrani S, House J i wsp. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island's role in B7-H1 induction and immune evasion. *PLoS One* 2015; 10: e0121841.
39. Patel SK, Pratap CB, Jain AK i wsp. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol* 2014; 20: 12847–12859.
40. Mégraud F. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. *Therap Adv Gastroenterol* 2012; 5: 103–109.
41. Kalinka-Warzocha E. Optymalizacja leczenia chłoniaków B-komórkowych o niskim stopniu złośliwości. *Onkol Prakt Klin* 2007; 3: 140–149.
42. Cammarota G, Montalto M, Tursi A i wsp. *Helicobacter pylori* reinfection and rapid relapse of low-grade B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1995; 345: 192.
43. Krisch LM, Posselt G, Hammerl P i wsp. CagA phosphorylation in *Helicobacter pylori*-infected B cells is mediated by the nonreceptor tyrosine kinases of the Src and Abl families. *Infect Immun* 2016; 84: 2671–2680.
44. Laur AM, Floch P, Chambonnier L i wsp. Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: Lessons from an animal model. *Oncotarget* 2016; 7: 3394–3402.
45. Romero-Adrián TB, Leal-Montiel J. *Helicobacter pylori* infection: Regulatory T cells and their participation in the immune response. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6: e5183.
46. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* 2017; 27: 109–118.
47. Hart KM, Byrne KT, Molloy MJ i wsp. IL-10 immunomodulation of myeloid cells regulates a murine model of ovarian cancer. *Front Immunol* 2011; 2: 29.
48. Barthel SR, Gavino JD, Descheny L i wsp. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 1473–1491.
49. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE i wsp. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 641–648.