

Дослідження вперше опубліковано 5 листопада 2024 р. у міжнародному науковому журналі з відкритим доступом PLoS One, Каліфорнія, Америка doi: [10.1371/journal.pone.0313251](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0313251)

# Протизапальна дія еупатіліну при *H. pylori*-асоційованому гастриті

[Пон Ен Лі](#)<sup>1,2,\*</sup>, [Су Джин Парк](#)<sup>2,\*</sup>, [Гван Ха Кім](#)<sup>1,2,\*</sup>, [Донг Чан Джу](#)<sup>1,2</sup>, [Мун Вон Лі](#)<sup>1,2</sup>

Редактор: Саїд Гавамі<sup>3</sup> Університет Манітоба. Канада

PMCID: PMC11537371 PMID: [39499687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39499687/)

## Анотація

---

Як відомо Еупатілін, флавіон, виділений із видів *Artemisia*, має протизапальну, антиоксидантну та протипухлинну дію. Дослідження мало на меті поглиблено вивчити протизапальну дію еупатіліну на епітеліальні клітини шлунка, інфіковані *Helicobacter pylori*.

## Матеріали та методи

AGS клітини шлунка людини були інфіковані CagA-позитивним *H. pylori*, а потім оброблені еупатіліном. Через 24 години рівні експресії CagA, фосфоінозитид-3-кінази 1 (PI3K), ядерного фактора (NF)-κB, інтерлейкіну (IL)-1β і фактора некрозу пухлини (TNF)-α в клітинних лізатах вимірювали за допомогою вестерн-блоттингу, а також рівнів мРНК IL-6, IL-8 і білка хемоаттрактанта моноцитів (MCP)-1 вимірювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

## Результати

Транслокація CagA в клітини AGS призвела до подовженої морфології клітин, яка була зупинена після початку лікування еупатіліном. Імунофлуоресцентне фарбування на анти-CagA показало, що лікування еупатіліном залежно від дози пригнічує експресію CagA в *H. pylori*-інфіковані клітини AGS.

*H. pylori* підвищував рівні прозапальних цитокінів, включаючи IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 і MCP-1, а лікування еупатіліном значно знижувало рівні цих цитокінів залежно від дози. Крім того, лікування еупатіліном пригнічувало експресію PI3K і NF-κB.

## Висновки

Лікування еупатіліном продемонструвало протизапальну дію на CagA-позитивний *H. pylori* та інфіковані епітеліальні клітини шлунка шляхом інгібування транслокації CagA, тим самим пригнічуючи шлях передачі сигналу NF-κB. Ці результати свідчать про те, що еупатілін відіграє захисну роль проти CagA-позитивного *H. pylori*-індукованого гастриту.

## Вступ

---

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) викликає хронічне запалення слизової оболонки шлунка (гастрит), яке може прогресувати до основних захворювань шлунка, включаючи виразкову хворобу, рак шлунка та лімфому лімфоїдної тканини, пов'язану зі слизовою оболонкою шлунка [1]. ENREF\_1 Цитотоксин-асоційований ген А (CagA) є важливим фактором вірулентності *H. pylori*, а транслокація CagA в епітеліальні клітини шлунка індукує клітинну трансформацію до подовженої форми, що називається фенотипом колібрі, який характеризується одним або декількома виступами на клітинній мембрані; цей фенотип

викликає широкий спектр змін у клітинній передачі сигналів, що призводить до інфільтрації нейтрофілів і лімфоцитів, а також до збільшення прозапальних цитокінів [ 2 ]. CagA активує сигнальний шлях ядерного фактора (NF)-κB, який сприяє експресії прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін (IL)-1β, IL-6, IL-8 і фактор некрозу пухлини (TNF)-α, зрештою викликаючи стійке запалення шлунка [ 3 ]. *H. pylori* CagA-індукована хронічна запальна відповідь є сильним фактором ризику розвитку пептичної виразки та раку шлунка; отже, інгібування цих запальних каскадів має важливе значення для лікування *H. pylori* - асоційовані захворювання шлунка.

Еупатилін (5,7-дигідрокси-3,4,6-триметоксифлавоон, доступний як комерційний препарат, Stillen<sup>®</sup>), флавоон, виділений із видів *Artemisia*, має протизапальну, антиоксидантну та протиракову дію [ 4 , 5 ]. Флавоноїди, клас поліфенольних сполук у різних рослинах, проявляють біоактивні властивості в клітинах людини [ 6 ]. Листя *артемізії* мають багату історію традиційного використання для лікування запальних і виразкових захворювань у Кореї [ 7 ]. Еупатилін — фармакологічно активна сполука, виділена з екстракту *артемізії азійської* [ 8 ]. Він знижує рівні прозапальних цитокінів TNF-α, IL-6 та IL-1β шляхом пригнічення NF-κB-опосередкованого сигнального шляху [ 9 , 10 ]. Дослідження *in vitro* показали, що eupatilin захищає епітеліальні клітини шлунка від індометацин-індукованого окислювального клітинного пошкодження [ 11 ] і індукованого етанолом пошкодження слизової оболонки шлунка шляхом інгібування запалення, посилення захисту слизової оболонки шлунка та послаблення окисного стресу [ 12 ].

Незважаючи на значні докази щодо протизапальної дії eupatilin, мало відомо про вплив цієї сполуки на *H. pylori* - асоційоване запалення шлунка. Тому ми мали на меті дослідити вплив eupatilin на продукцію прозапальних цитокінів і сигнальні шляхи в епітеліальних клітинах шлунка, інфікованих CagA- позитивним *H. pylori*.

## Матеріали за метод

---

### *H. pylori* штам і культура

*H. pylori* ATCC 43504 (CagA-позитивний штам і штам типу vacA s1-m1) було отримано з Американської колекції типових культур (ATCC; Роквіль, Меріленд, США). *H. pylori* культивували в мікроаерофільних умовах (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> і 85% N<sub>2</sub>) на пластині з шоколадним агаром (Synergy Innovation, Корея) при 37°C протягом 3 днів. Після інкубації протягом 3 днів 200 мкл інфузії мозку серця з додаванням 5% фетальної бичачої сироватки (FBS; Gibco, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) додавали до бажаної кількості шоколадного агару в 1,5 мл пробірці Eppendorf.

### Культура клітин і *H. pylori* інфекція

Клітини шлунка людини AGS (ATCC CRL-1739) були придбані в ATCC (Rockville). Клітини AGS висівали в середовище Roswell Park Memorial Institute 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) з додаванням 10% інактивованого FBS і 1% пеніциліну (Sigma, Burlington, MA, USA), а потім культивували у зволоженій атмосфері, що містить 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Після досягнення 70% конфлюентності клітини інкубували в безсироватковому середовищі протягом 24 годин, а потім інфікували *H. pylori* при множинності інфекції 200:1.

### Медикаментозне лікування

Еупатілін, поставлений Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd. (Сеул, Корея), розчиняли в 10% диметилсульфоксиді. Клітини AGS обробляли 10, 50 і 100 нг еупатіліну протягом 24 годин після *H. pylori* інфекція.

## Життєздатність клітин (тест на цитотоксичність)

Клітини AGS висівали в кількості  $1 \times 10^3$  клітин/лунку в 96-лункові планшети, а потім обробляли 10, 50 і 100 нг еупатіліну протягом 24 годин. Життєздатність клітин вимірювали за допомогою аналізу Cell Counting Kit-8 (ССК-8; Enzo Life Science, Нью-Йорк, США) відповідно до інструкцій виробника. Планшет додавали 10 мкл реагенту ССК-8 і потім інкубували при 37°C протягом 2 годин. Оптичну густину при 450 нм вимірювали за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів (JSBIO, Сеул, Корея). Життєздатність клітин виражали як відносну абсорбцію оброблених клітин AGS до необроблених клітин (контроль).

## Морфологічні зміни після *H. pylori* інфекція

Морфологічні зміни в клітинах AGS досліджували через 24 години інфікування *H. pylori* та після лікування еупатіліном. Клітини, що демонструють подовжений фенотип колібрії, підраховували в п'яти полях у трьох чашках.

## Імунофлуоресцентне фарбування

Імунофлуоресцентне фарбування проводили для ідентифікації CagA-позитивних клітин AGS після *H. pylori* інфекція. Коротко кажучи, клітини AGS висівали в кількості  $1 \times 10^4$  клітин/лунку на 12-міліметрове покривне скло на дні 24-лункових планшетів між лунками. Після *H. pylori*, клітини обробляли 10, 50 і 100 нг еупатіліну протягом 24 годин. Клітини промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином (PBS), фіксували 4% формальдегідом протягом 20 хвилин при 4°C, а потім пермеабілізували 0,1% Triton X-100 протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Згодом їх блокували протягом 30 хвилин у блокуючому розчині, а потім інкубували протягом 1,5 годин з первинним антитілом проти CagA (Сантакруз, Даллас, США). Нарешті, клітини промивали PBS, інкубували з Alexa Fluor 594-кон'югованим антимишачим вторинним антитілом (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США), а потім фарбували 0,5 мкг/мл розчину DAPI (Abcam, Кембридж, Великобританія) для ядерного фарбування. Зображення клітин були зроблені в 4–6 полях у трьох лунках і оцінені за допомогою флуоресцентного мікроскопа Eclipse Ti-E (Nikon, Токіо, Японія) при 20-кратному збільшенні.

## Вестерн-блот

Після обробки еупатіліном протягом 24 годин клітини AGS збирали та лізували в буфері для лізису [рН 7,6, 4 мМ гідрохлориду 4-(2-аміноетил) бензолсульфонілфториду, 2 мМ бензамідину, 10 мМ лейпептину, 10 мМ пепстатину А, 1 мМ EDTA, 10 мМ EGTA та інгібітори фосфатів (Translab, Теджон, Корея)]. Клітини аналізували за допомогою набору для аналізу білка BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Зразки, що містять однакову кількість білка (50 мкг), відокремлювали електрофорезом у 4–15% додецилсульфату натрію в поліакриламідному гелі та переносили на мембрану з полівініліденфториду (PVDF). Мембрану PVDF блокували 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну при 15°C протягом 1,5 години, а потім інкубували протягом ночі при 4°C з одним із таких первинних антитіл: Cag A (1:1000; Santacruz), фосфоінозитид-3-кіназа (PI3K; 1:1000; Santacruz), NF-κB (1:1000; Cell Signaling, Денверс, США), TNF-α (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), IL-1β (1:1000; Cell Signaling) і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (GAPDH; 1:1000; Santacruz) як внутрішній контроль. Наступного дня

мембрану поміщали в трис-буферизований фізіологічний розчин-твін-20, промивали при 15°C протягом 1,5 години, а потім інкубували при 15°C протягом 2 годин із вторинним антитілом (мишачий анти-кролячий IgG-HRP, анти-мишачий IgG-HRP, Santa Cruz). Нарешті, для виявлення маркерів використовувався набір для хемілюмінесцентного вестерн-блоттингу (SmartGene ECL High Femto Solution; SmartGene Soft, Daejeon, Korea). Оптичну щільність білкових смуг визначали за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.52. Усі білки були визначені кількісно відносно GAPDH, і кількісні значення були представлені на гістограмі.

## Аналіз експресії мРНК

Загальну клітинну РНК екстрагували з оброблених еупатіліном клітин AGS за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зворотної транскрипції (RT-PCR) за допомогою міні-набору RNeasy plus (QIAGEN, Hilden, Німеччина) відповідно до протоколів виробника. Коротко, 2 мкг загальної РНК змішували з 1 мкг оліго dT (Promega, Вісконсін, США) у загальному об'ємі <15 мкл, і суміш нагрівали при 70°C протягом 5 хв. Згодом до нагрітої суміші додавали 1,25 мкл dNTP (Promega) і M-MLV зворотної транскриптази (Promega) у загальному об'ємі 20 мкл. кДНК синтезували шляхом зворотної транскрипції при 42°C протягом 60 хв і при 95°C протягом 5 хв. Послідовності праймерів для ПЛР були такими: IL-6 ( 5'-TCGTGGAAATGAGAAAAGAGTTG-3'; 5'-GACCACAGTGAGGAATGTCCAC-3') [ 13 ], IL-8 ( 5'-AGGGTTGCCAGATGCAATAC-3'; 5'-AAACCA AGGCACAGTGGAAC-3') [ 14 ] і MCP-1 ( 5'-ССАААГААГСТГТАГТТТТТГТС-3'; 5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGG-3') [ 13 ]. GAPDH ( 5'-САССТТСТGСАААТТАТGGCG-3'; 5'-АССТТТGССААГТСТААСТГТТАА-3') [ 15 ] використовували як внутрішній контроль. ПЛР у реальному часі проводили з використанням 12,5 мкл 2X TOPsimple™ DyeMIX-Tenuto (Enzynomics, Корея) і 2 мкл матриці кДНК в кінцевому обсязі 25 мкл. Суміш інкубували при 94 °C протягом 4 хв 54–59 °C із збільшенням на 0,5 °C протягом 30 с. Остаточне розширення проводилося при 72 °C протягом 30 с, після чого після останнього циклу проводився аналіз температури плавлення зразків при 54–94 °C 1.52. Усі мРНК були кількісно визначені відносно GAPDH, а кількісні значення були представлені на гістограмі.

## Статистичний аналіз

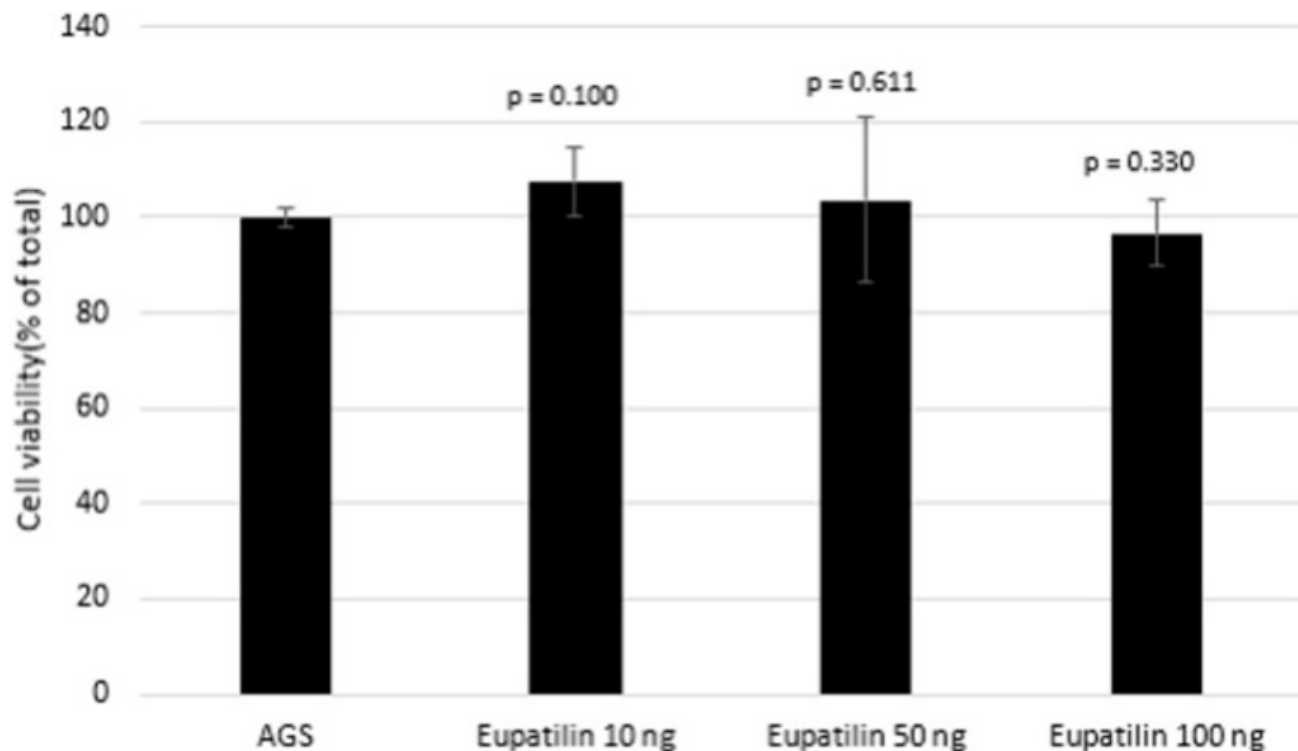
Дані виражені як середнє значення ± стандартне відхилення, і статистичний аналіз проводився за допомогою *t*-критерію Стьюдента з порогом значущості, встановленим на рівні ймовірності 0,05.

## Результати

### Вплив еупатіліну на транслокацію CagA в клітини AGS і CagA-індуковані морфологічні зміни

Спочатку оцінювали вплив еупатіліну на життєздатність клітин. Лікування еупатіліном призводить до рівня виживання >90% в аналізі ССК-8 і не демонструє значної цитотоксичності навіть при високій концентрації 100 нг ( [рис. 1](#) ). Транслокація CagA в клітини AGS спричинила подовжений фенотип колібрі ( [рис. 2A](#) ), який є характерними морфологічними змінами, спричиненими CagA через кілька послань [ 16 , 17 ]. Лікування еупатіліном значно пригнічувало вироблення клітин колібрі залежно від дози ( [рис. 2A та 2B](#) ). Імунофлуоресцентне фарбування на анти - CagA також показало, що лікування еупатіліном залежно від дози інгібує експресію CagA в *H. pylori* -інфіковані клітини AGS ( [рис. 3](#) ).

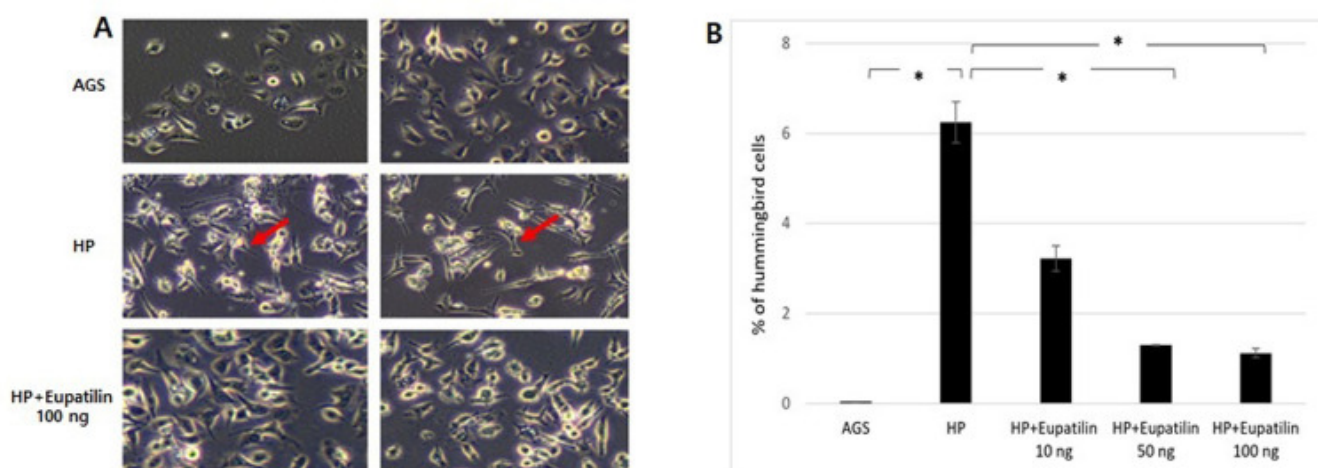
Рис. 1. Цитотоксичність еупатіліну на клітинах карциноми шлунка AGS людини.



[Відкрити в новій вкладці](#)

Клітини AGS обробляли еупатіліном (10, 50 або 100 нг) протягом 24 годин, і їх життєздатність визначали за допомогою аналізу Cell Counting Kit-8 (Enzo Life Science, NY, USA). HP = *Helicobacter pylori*.

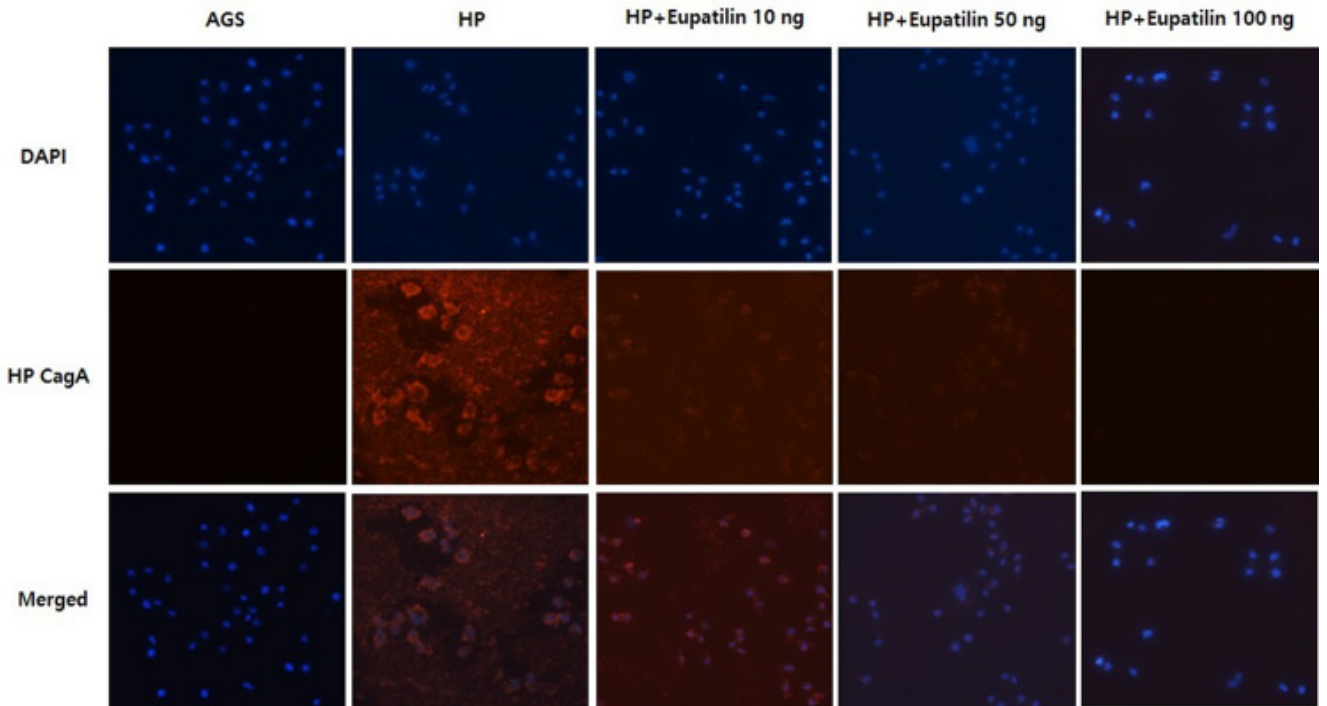
Рис. 2. Морфологічні зміни (клітини колибрі), індуковані транслокацією CagA *Helicobacter pylori*.



[Відкрити в новій вкладці](#)

(А) Транслокація CagA в клітини AGS збільшила кількість клітин колибрі (червоні стрілки), а лікування еупатіліном (100 нг) пригнічувало виробництво клітин колибрі. (В) Еупатілін зменшив кількість клітин колибрі залежно від дози. HP = *Helicobacter pylori*.

Рис. 3. Імунофлуоресцентне фарбування антитілами до CagA та контрастне фарбування ДНК DAPI (синій).



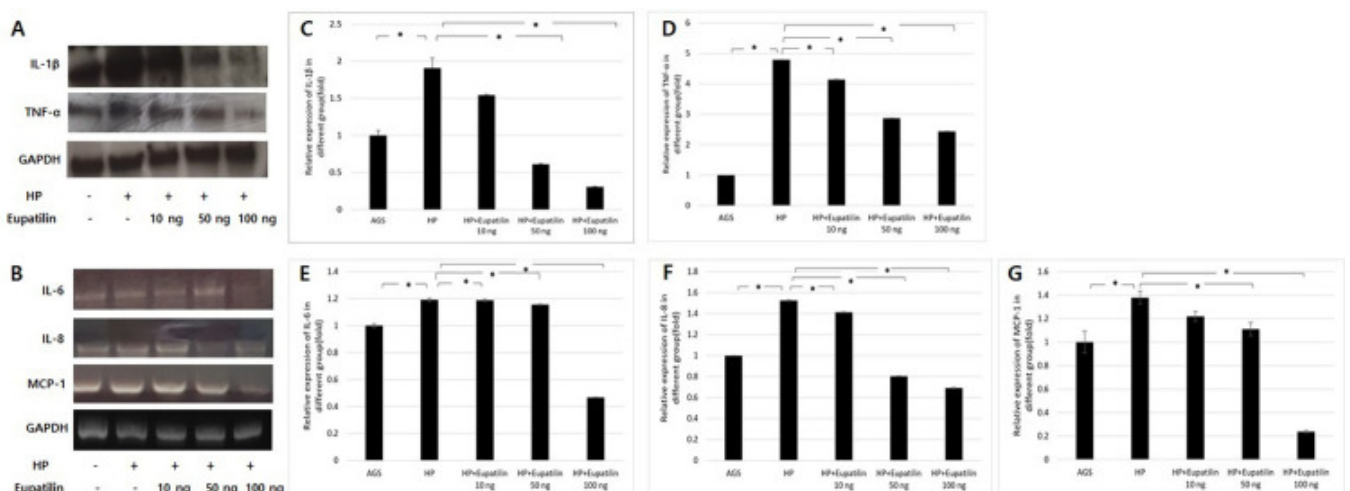
[Відкрити в новій вкладці](#)

Еупатілін продемонстрував дозозалежну інгібіторну дію на експресію CagA в клітинах AGS, інфікованих *Helicobacter pylori* (збільшення, 20×). HP = *Helicobacter pylori*.

## Протизапальна дія еупатіліну на *H. pylori* CagA-інфіковані клітини AGS

Результати вестерн-блоттингу на експресію білка IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  у *H. pylori*-інфіковані клітини AGS до та після лікування еупатіліном показані на [рис. 4А](#). Результати RT-PCR на рівні мРНК IL-6, IL-8 та MCP-1 у *H. pylori*-інфіковані клітини AGS до та після лікування еупатіліном показано на [рис. 4В](#). *H. pylori* підвищувала рівні прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 та MCP-1, а лікування еупатіліном значно знижувало рівні цих маркерів запалення залежно від дози ([рис. 4С–4Г](#)). Ці результати свідчать про те, що еупатілін виявляє протизапальну дію шляхом ефективного пригнічення експресії та виробництва прозапальних цитокінів у *H. pylori*-інфіковані епітеліальні клітини шлунка.

Рис. 4. Еупатілін пригнічує прозапальні цитокіни в клітинах AGS, інфікованих *Helicobacter pylori*.



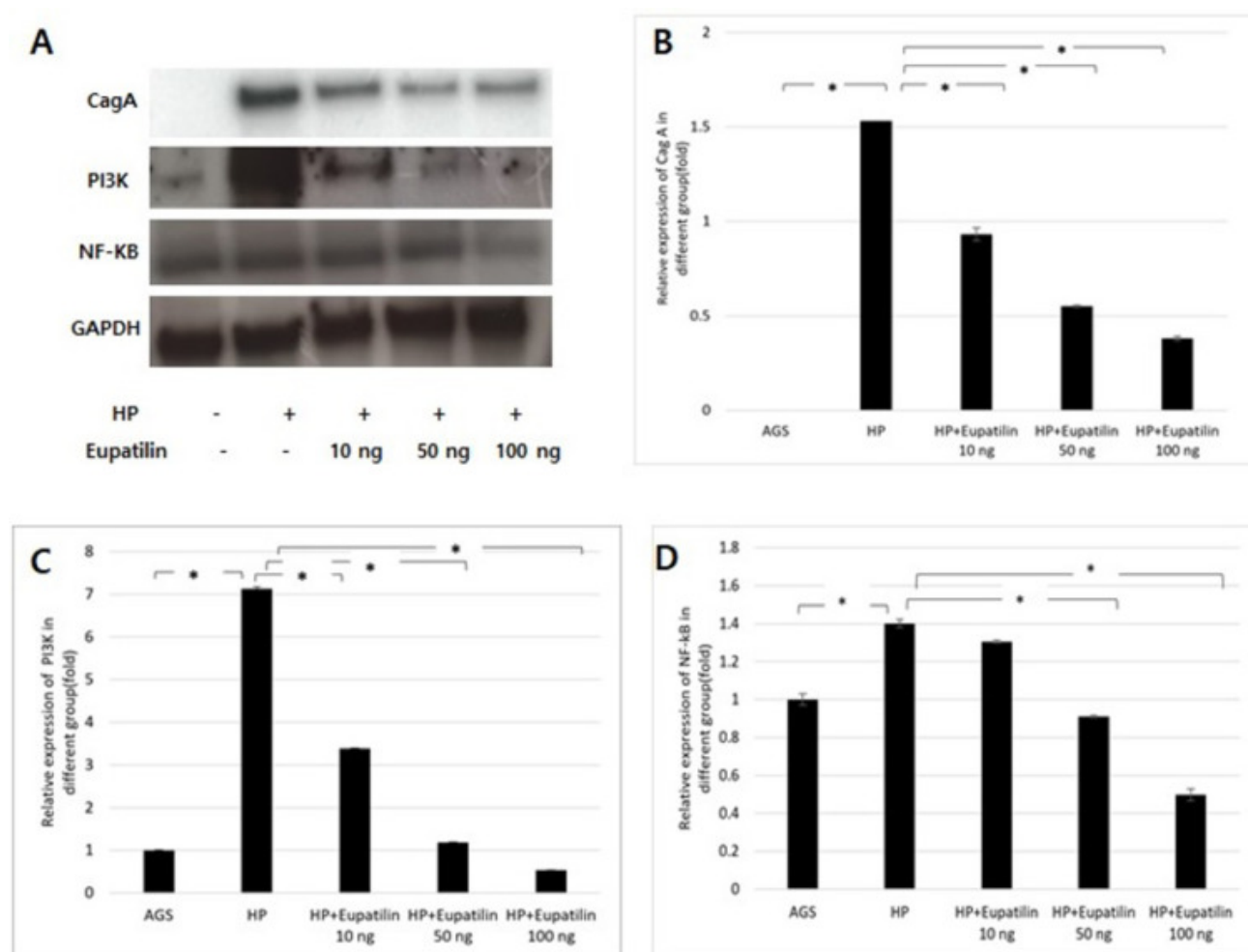
[Відкрити в новій вкладці](#)

Рівні білка IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  визначали за допомогою вестерн-блоттингу (A), а експресію мРНК IL-6, IL-8 і MCP-1 визначали за допомогою RT-PCR (B). GAPDH використовувався як внутрішній контроль. Статистичну значущість IL-1  $\beta$  (C), TNF- $\alpha$  (D), IL-6 (E), IL-8 (F) і MCP-1 (G) аналізували за допомогою *t*-критерію Стьюдента. \* *p* < 0,05. HP = *Helicobacter pylori*.

## Протизапальну дію еупатіліну через інгібування *H. pylori* CagA-індукований NF- $\kappa$ B сигнальний шлях у клітинах AGS

CagA не експресувався в клітинах AGS без *H. pylori* інфекція. Експресія CagA зростає в клітинах з *H. pylori*, але ця експресія залежно від дози зменшувалася в інфікованих клітинах після лікування еупатіліном (рис. 5A та 5B). Крім того, лікування еупатіліном залежно від дози пригнічувало експресію PI3K і NF- $\kappa$ B (рис. 5C і 5D). Ці результати свідчать про те, що еупатілін інгібує *H. pylori*-індуковані запальні реакції шляхом інгібування сигнального шляху CagA/PI3K/NF- $\kappa$ B.

Рис. 5. Еупатілін виявляв протизапальну дію шляхом пригнічення сигнального шляху CagA/PI3K/NF- $\kappa$ B в інфікованих *Helicobacter pylori* клітинах AGS.



[Відкрити в новій вкладці](#)

Експресію білка CagA, PI3K і NF- $\kappa$ B визначали за допомогою вестерн-блоттингу (A). GAPDH використовувався як внутрішній контроль. Статистичну значущість CagA (B), PI3K (C) і NF- $\kappa$ B (D) аналізували за допомогою *t*-критерію Стьюдента. \* *p* < 0,05. HP = *Helicobacter pylori*.

## Обговорення

*H. pylori* є важливою причиною хронічного гастриту, який може прогресувати до виразкової хвороби або злоякісних пухлин шлунка, включаючи аденокарциному та лімфому лімфоїдної тканини, асоційовану зі слизовою оболонкою [ 18 ]. Зокрема, *X. pylori* -індукований хронічний гастрит є першим кроком у багатоступінчастому каскаді аденокарциноми шлунка [ 19 ]. CagA є найважливішим фактором вірулентності *H. pylori*, оскільки він визначає тяжкість запалення шлунка та наслідки інфекції. Транслокація CagA від бактерій до епітеліальних клітин шлунка через систему секреції типу IV активує NF-κB, головний прозапальний сигнальний шлях, який сприяє вивільненню прозапальних цитокінів, які беруть участь у проліферації, ангиогенезі, інвазії та блокаді апоптозу [ 20 ]. CagA також викликає запалення та окислювальний стрес через різні шляхи, включаючи IL-11/сигнальний перетворювач та активатор транскрипції (STAT)-3/CDX2, c-Myc/p21/екстрацелюлярну сигнальну регульовану кіназу (ERK)-мітоген-активовану протеїнкіназу (MAPK), toll-подібний рецептор і активні форми кисню/регуляцію сигналу апоптозу kinase-1/c-Jun N-термінальна кіназна передача сигналів [ 21 ], що призводить до пошкодження ДНК і геномної нестабільності, зрештою збільшуючи ризик розвитку раку шлунка. Вакуолізуючий цитотоксин А, уреаза, джгутик, каталаза та супероксидадисмутаза є іншими *H. pylori* фактори вірулентності, які сприяють канцерогенезу та забезпечують колонізацію та проліферацію. Ці фактори не тільки індукують запальні реакції, але й контролюють і регулюють ці реакції, підтримуючи хронічне запалення та, зрештою, викликаючи злоякісні зміни [ 22 ]. Антибіотикотерапія є основним методом лікування *H. pylori* інфекція. Однак постійне зростання резистентності до антибіотиків у всьому світі та можливий дисбактеріоз шлунка чи кишечника після *H. pylori* ускладнює лікування *H. pylori* інфекція. Крім того, у деяких людей є непереносимість антибіотиків, і хронічне запалення та тривале пошкодження тканин можуть зберігатися навіть після *H. ерадикація pylori*. Ці висновки підкреслюють необхідність захисних засобів проти *H. pylori* -індукований гастрит. У цьому дослідженні еупатілін виявляв протизапальні властивості при CagA- позитивному *H. pylori*-інфіковані епітеліальні клітини шлунка. Це дослідження пропонує безпечний та ефективний альтернативний терапевтичний підхід, який використовує природну сполуку для лікування *H. pylori* -індукованого гастриту.

Еупатілін запобігає пошкодженню тканин завдяки своїй протизапальній, антиоксидантній, протираковій та антимікробній дії. Він також зменшує TNF-α-індукований IL-8 і хемокін (мотив CC) ліганд 20 (CCL20) шляхом блокування шляхів кінази p38 і NF-κB в клітинах AGS шлункового епітелію людини, припускаючи, що гастропротекторний ефект eupatilinu може бути пов'язаний із сигнальним шляхом NF-κB [ 23 ]. У доклінічних дослідженнях eupatilinu ефективно зменшував спричинені етанолом шлунково-геморагічні ураження, пригнічуючи перекисне окислення ліпідів у шлунку та активність ксантинооксидази до нормального рівня, що означає, що основним протигастритним механізмом eupatilinu є поглинання радикалів [ 24 ]. Крім того, лікування високими дозами eupatilinu покращує хронічний ерозивний гастрит шляхом зменшення довжини ерозії, зменшення спричиненого таурохолатом фіброзу кишечника та збільшення вмісту глутатіону залежно від дози [ 25 , 26 ]. Подальші клінічні дослідження показали, що eupatilinu має кращу ефективність і безпеку, ніж мізопростол, для лікування гастродуоденального ураження, пов'язаного з прийомом нестероїдних протизапальних препаратів [ 27 , 28 ].

Незважаючи на значні докази щодо протизапальної дії eupatilinu, мало відомо про вплив цієї сполуки на *H. pylori* -асоційований гастрит. Ко та ін. повідомили, що похідне eupatilinu 7-карбоксиметилокси-3',4',5'-триметокси флавон проявляє протизапальну активність

у *H. pylori*-інфіковані епітеліальні клітини шлунка шляхом індукування дисоціації комплексу ІКК- $\gamma$ -Hsp90 і пригнічення передачі сигналу NF- $\kappa$ B [ 30 ]. *H. pylori* CagA сприяє NF- $\kappa$ B через численні сигнальні шляхи через активацію Ras/Raf, P21-активованої кінази 1, PI3K або TNF- $\alpha$ -асоційованого фактора б/трансформуючого фактора росту- $\beta$ -активованої кінази 1 [ 31 ]. Крім того, еупатілін може пригнічувати NF- $\kappa$ B-опосередковану запальну відповідь і пригнічувати продукцію цитокінів, включаючи IL-6 та IL-1 $\beta$ , у відповідь на ліпополісахарид [ 23 ]. У цьому дослідженні ми визначили інгібуючу дію eupatilinu на *H. pylori* CagA-індукований гастрит, зосереджуючись на сигнальному шляху CagA/PI3K/NF- $\kappa$ B. CagA стимулює передачу сигналів PI3K, що впливає на Akt, а потім Akt активує NF- $\kappa$ B через активацію кінази ІкВ, нарешті сприяючи транскрипції прозапальних цитокінів. Спочатку ми ідентифікували морфологічні зміни, пов'язані з CagA-індукованим запаленням в епітеліальних клітинах шлунка. Результати показали, що лікування eupatilinom скасовувало *H. pylori* CagA-індуковане подовження клітин (клітини колібрі) шляхом полегшення транслокації CagA з *H. pylori* в клітини AGS. Крім того, eupatilин залежно від дози пригнічував експресію прозапальних цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 та MCP-1, шляхом зниження регуляції запального шляху, опосередкованого PI3K/NF- $\kappa$ B. Ці результати свідчать про те, що eupatilин ефективно пом'якшує *H. pylori* CagA-індукований гастрит шляхом пригнічення вироблення прозапальних цитокінів і пригнічення сигналізації CagA/PI3K/NF- $\kappa$ B.

Ми використали лінію клітин шлунка людини AGS замість звичайної лінії клітин шлунка, які мали підвищений рівень запалення *H. pylori*. Тим не менш, клітини AGS мають сильну життєздатність і широко використовувалися для розуміння наслідків інфекції для епітеліальних клітин, особливо в експериментах щодо відповіді на інфікування *H. pylori* [ 16 ]. Тому ми думали, що клітини AGS можуть служити альтернативною моделлю для нормальних епітеліальних клітин шлунка в цьому дослідженні. Далі, незважаючи на переконливі *in vitro* докази протизапальної дії eupatilinu на *H. pylori* CagA-інфікованих епітеліальних клітин шлунка, точні механізми дії eupatilinu *in vivo* залишаються неясними. Взаємодія *H. pylori* з хазяїном включає складні фактори хазяїн-середовище, які не можуть бути повністю відтворені в дослідженнях *in vitro*. Таким чином, необхідні подальші дослідження *in vivo* для визначення безпечної та ефективної дози eupatilinu для прояву протизапальної дії проти *H. pylori*-індукований гастрит. Крім того, ми не підтвердили прямий вплив eupatilinu на передачу сигналів PI3K/NF- $\kappa$ B. Спочатку ми зосередилися на інгібуючому ефекті eupatilinu на *H. pylori* CagA, фактор, який, як відомо, активує сигнальний шлях PI3K/NF- $\kappa$ B, а не його пряму дію на шляхи PI3K/NF- $\kappa$ B. Ми визначили, що лікування eupatilinom залежно від дози пригнічує експресію CagA, що може достатньою мірою пригнічувати CagA-індуковані шляхи PI3K/NF- $\kappa$ B. Крім того, на додаток до сигнального шляху NF- $\kappa$ B, інші сигнальні шляхи, включаючи ERK/MAPK і Янус-кіназу/STAT, беруть участь у гастриті та канцерогенезі, індукованому *H. pylori* інфекція. Необхідно провести майбутні дослідження, щоб виявити інші протизапальні шляхи дії eupatilinu та визначити, чи має він пряму протипухлинну активність у профілактиці або лікуванні раку шлунка. Нарешті, у цьому дослідженні використовували AGS, лінію епітеліальних клітин шлунка, отриману від пацієнта з аденокарциномою шлунка. Це важливий момент, оскільки метаболізм клітин AGS, які є трансформованими клітинами, виділеними з ракових клітин, можуть неточно відображати метаболізм нормальних епітеліальних клітин шлунка. Тим не менш, *X. pylori*-інфіковані клітини AGS можуть служити моделлю для нормальних епітеліальних клітин шлунка, які піддаються впливу *H. pylori*, враховуючи, що клітини AGS широко використовувалися в експериментах щодо відповіді на *H. pylori*.

Підсумовуючи результати, eupatilин виявляє протизапальну дію на інфіковані *H. pylori*-епітеліальні клітини шлунка. Лікування eupatilinom призводить до рівня виживання клітин шлунку >90%. Eupatilин запобігає пошкодженню тканин завдяки своїй протизапальній, антиоксидантній, протираковій та антимикробній дії.

Ці результати свідчать про те, що еупатилін відіграє важливу роль при лікуванні *H. pylori* -індукованих гастритах.

## References

1. Malfertheiner P, Schulz C, Hunt RH. *H. pylori* infection: A 40-year journey through shifting the paradigm to transforming the management. *Dig Dis*. 2024; 42:299–308.
2. Bagnoli F, Buti L, Tompkins L, Covacci A, Amieva MR. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:16339–16344. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502598102> PMID: 16258069
3. Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001; 107:7–11.
4. Nageen B, Sarfraz I, Rasul A, et al. Eupatilin: a natural pharmacologically active flavone compound with its wide range applications. *J Asian Nat Prod Res*. 2020; 22:1–16. <https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1492565> PMID: 29973097
5. Cheong J-H, Hong SY, Zheng Y, Noh SH. Eupatilin inhibits gastric cancer cell growth by blocking STAT3-mediated VEGF expression. *J Gastric Cancer*. 2011; 11:16. <https://doi.org/10.5230/jgc.2011.11.1.16> PMID: 22076197
6. Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007; 10:724–728. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f0cef2> PMID: 18089954
7. Ryu BK, Ahn BO, Oh TY, Kim SH, Kim WB, Lee EB. Studies on protective effect of DA-9601, *Artemisia asiatica* extract, on acetaminophen-and CCI 4-induced liver damage in rats. *Arch Pharm Res*. 1998; 21:508–513.
8. Seo H-J, Surh Y-J. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Mutat Res*. 2001; 496:191–198. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00234-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00234-0) PMID: 11551495
9. Chang JW, Hwang HS, Kim YS, et al. Protective effect of *Artemisia asiatica* (Pamp.) Nakai ex Kitam ethanol extract against cisplatin-induced apoptosis of human HaCaT keratinocytes: Involvement of NF $\kappa$ B and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling. *Phytomedicine*. 2015; 22:679–688. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.04.003> PMID: 26055133
10. Choi E-J, Lee S, Chae J-R, Lee H-S, Jun C-D, Kim S-H. Eupatilin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory mediators in macrophages. *Life Sci*. 2011; 88:1121–1126. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.04.011> PMID: 21565208
11. Choi E-J, Oh H-M, Na B-R, et al. Eupatilin protects gastric epithelial cells from oxidative damage and down-regulates genes responsible for the cellular oxidative stress. *Pharm Res*. 2008; 25:1355–1364. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9531-5> PMID: 18299966
12. Du K, Zheng C, Kuang Z, et al. Gastroprotective effect of eupatilin, a polymethoxyflavone from *Artemisia argyi* H. Le' v. & Vaniot, in ethanol-induced gastric mucosal injury via NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 2024; 318:116986.
13. Kyriakopoulos G, Lambropoulou M, Valsami G, et al. Pro-inflammatory cytokines/chemokines, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1, as biomarkers for the nephro-and pneumoprotective effect of silibinin after hepatic ischemia/reperfusion: Confirmation by immunohistochemistry and qRT-PCR. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2022; 130:457–467.
14. You D, Jeong Y, Yoon SY, et al. Celastrol attenuates the inflammatory response by inhibiting IL-1 $\beta$  expression in triple-negative breast cancer cells. *Oncol Rep* 2021; 45:89.
15. Pouv AK. Molecular interactions of environmental chemicals with tuna and honeybee xenobiotic defense transporter P-glycoprotein: Using ligand-binding site conservation to predict chemical