

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk



Agnieszka Razim

**Określenie epitopów białek powierzchniowych
Clostridium difficile oraz charakterystyka immunochemiczna
koniugatu epitopu z nośnikiem i nanoadiuwantu**

Promotor

Prof. dr hab. Andrzej Myc

Promotor pomocniczy:

Dr hab. Sabina Górńska

Praca doktorska wykonana

w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Wrocław 2020

*Promotorowi,
prof. dr hab. Andrzejowi Mycowi
składam serdeczne podziękowania
za opiekę merytoryczną, pouczające rozmowy,
oraz nieustające wsparcie w trakcie realizacji niniejszej pracy.*

*Promotorowi pomocniczemu,
dr hab. Sabinie Górskiej
dziękuję za opiekę merytoryczną,
oraz wsparcie w trakcie trudnych chwil w laboratorium.*

*Prof. dr hab. Andrzejowi Gamianowi,
wszystkim pracownikom Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej,
za pomoc w realizacji niniejszej pracy.*

*Rodzicom,
dziękuję za wsparcie i wiarę we mnie,
a Mateuszowi, za wyrozumiałość i cierpliwość.*

Pracę dedykuję Babci Róży

Spis treści

1. Streszczenie	4
2. Summary.....	5
3. Wykaz skrótów	6
4. Wstęp.....	9
4.1. Immunologia śluzówki	9
4.2. Szczepionki.....	15
4.2.1. Adiuwanty	19
4.2.2. Pozostałe składniki szczepionek	26
4.3. Szczepionki donosowe.....	26
4.4. Badania nad szczepionką przeciwko <i>Clostridium difficile</i>	29
4.4.1. Charakterystyka zakażeń <i>Clostridium difficile</i>	30
4.4.2. Odpowiedź wrodzonego układu odpornościowego na zakażenie.....	32
4.4.3. Odpowiedź adaptacyjnego układu odpornościowego na zakażenie	35
4.4.3.1. Odpowiedź na toksyny CD.....	35
4.4.3.2. Odpowiedź adaptacyjna na antygeny powierzchniowe CD	38
4.4.3.2.2. Białka warstwy S	41
4.4.3.2.3. Adhezyny	42
5. Cel pracy.....	46
6. Materiały i metody	47
6.1. Nowe epitopy <i>Clostridium difficile</i>	47
6.1.1. Odczynniki ogólne	47
6.1.2. Szczepy CD i ich hodowla	47
6.1.3. Opis stosowanych surowic	49
6.1.4. Izolacja i identyfikacja białek immunoreaktywnych	52
6.1.5. Analiza bioinformatyczna białka Cwp22	54
6.1.6. Metoda PEPSCAN	55
6.1.7. Identyfikacja i charakterystyka epitopu	57
6.1.8. Przygotowanie koniugatów peptydów z białkiem nośnikowym.....	58
6.2. Badania nad kandydatami na nanoadiuwanty (NAC).....	59
6.2.1. Odczynniki ogólne	59
6.2.2. Skład i przygotowanie nanoadiuwantów	59
6.2.3. Pomiar wielkości i ładunku kropel NAC	65
6.2.4. Długotrwała stabilność NAC	65
6.2.5. Interakcja nanoadiuwantu i mucyny	65

6.2.6.	Interakcja nanoadiuwantu i owalbuminy.....	66
6.2.7.	Wpływ nanoadiuwantu na owoalbuminę	67
6.2.8.	Sterylizacja NAC	67
6.2.9.	Wpływ obecności soli i fizjologicznego pH na stabilność NAC.....	67
6.2.10.	Linie komórkowe i ich hodowla	67
6.2.11.	Badanie cytotoksyczności nanoadiuwantów.....	68
6.2.12.	Wpływ nanoadiuwantów na indukcję TNF- α	69
6.2.13.	Wpływ nanoadiuwantów na pochłanianie i przekazywanie antygeny	69
6.2.14.	Badanie toksyczności NAC w eksperymencie <i>in vivo</i>	70
6.3.	Badanie właściwości immunogennych protoszczepionek	71
7.	Wyniki.....	74
7.1.	Badania nad nowymi epitopami CD	74
7.1.1.	Identyfikacja białka Cwp22 jako białka immunoreaktywnego	74
7.1.2.	Analiza bioinformatyczna białka Cwp22	79
7.1.3.	Przewidywanie epitopów białka Cwp22	82
7.1.4.	Mapowanie epitopów	84
7.1.5.	Charakterystyka zidentyfikowanych epitopów białka Cwp22	91
7.2.	Nanoadiuwant.....	93
7.2.1.	Badanie stabilności NAC.....	93
7.2.2.	Badanie bioadhezji NAC do mucyny	96
7.2.3.	Charakterystyka oddziaływań NAC z owalbuminą.....	99
7.2.4.	Wpływ sterylizacji na właściwości fizykochemiczne NAC	102
7.2.5.	Wpływ warunków panujących w jamie nosowej na stabilność NAC	103
7.2.6.	Badanie cytotoksyczności NAC względem komórek układu immunologicznego	105
7.2.7.	Badanie wzmacniającego efektu NAC na wytwarzanie TNF- α przez makrofagi z wykorzystaniem suboptymanego stężenia LPS.....	108
7.2.8.	Wpływ NAC na pobieranie antygeny przez komórki immunokompetentne .	109
7.2.9.	Wpływ NAC na przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami immunokompetentnymi	113
7.2.10.	Badanie toksyczności NAC w eksperymencie <i>in vivo</i>	114
7.2.11.	Podsumowanie danych otrzymanych dla NAC3, 7 i 13	116
7.3.	Badanie właściwości protoszczepionki złożonej z koniugatów epitopów CD z białkiem nośnikowym zawieszonych w NAC.....	118
7.3.1.	Charakterystyka koniugatów użytych w protoszczepionce.....	118
7.3.2.	Właściwości immunogenne protoszczepionki.....	120
8.	Dyskusja.....	134
9.	Wnioski	151

10.	Bibliografia	152
11.	Spis rycin	152
12.	Spis tabel.....	175
13.	Dorobek naukowy.....	176

1. Streszczenie

Clostridioides difficile (CD) jest bakterią, która z roku na rok dotyka coraz większą liczbę osób. Zakażenie jest związane ze stosowaniem antybiotyków, które poprzez zaburzenie składu ilościowego i jakościowego mikroflory jelitowej, umożliwiają rozwój patogennej bakterii. CD, po dostaniu się do organizmu, zaczyna produkować wyniszczające jelito toksyny, które doprowadzają do silnej biegunki i wystąpienia stanu zapalnego. Jediną, powszechnie stosowaną metodą leczenia, jest kuracja antybiotykowa. Opisano jednak pierwsze szczepy CD odporne na antybiotyki pierwszego rzutu stosowane do zwalczania zakażenia. Co więcej, kuracja antybiotykowa jest kosztowna i wiąże się z przedłużającym się pobytem chorego w szpitalu. Dlatego też, badania nad nowymi metodami leczenia i prewencji zakażeń CD są bezwzględnie konieczne.

W niniejszej pracy doktorskiej opisano nowe, immunoreaktywne białka CD, które mogą posłużyć jako antygeny szczepionkowe lub też mogą być zastosowane do produkcji leczniczych przeciwciał. Jedno z tych białek, a mianowicie białko Cwp22 poddano szczegółowemu mapowaniu celem określenia jego epitopów. Opisano proces analizy epitopów pod kątem ich przydatności szczepionkowej. Immunoreaktywne peptydy białka Cwp22, w koniugacie z białkiem nośnikowym, posłużyły do badania właściwości nowego adiuwantu dośluzówkowego. W ramach niniejszej pracy, przygotowano i scharakteryzowano zestaw nanoadiuwantów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Potwierdzono ich właściwości adiuwantowe w badaniach *in vivo*.

Przedstawione w tej pracy rozwiązania są uniwersalne i mogą być zastosowane również w przypadku innych zakażeń bakteryjnych czy też wirusowych. Przykładowo, scharakteryzowany w niniejszej pracy nanoadiuwant, może być z powodzeniem wykorzystany w przypadku innych antygenów. Prace zapoczątkowane w tej rozprawie będą kontynuowane.

Realizacja niniejszej pracy doktorskiej została wsparta dwoma grantami naukowymi przyznanymi przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 2016/21/B/NZ6/02286, PRELUDIUM 2015/17/N/NZ6/03512).

2. Summary

Clostridioides difficile (CD) is a bacterium that is affecting more and more people each year. The infection is associated with the use of antibiotics, which by disrupting the quantitative and qualitative composition of the intestinal microflora, allow the development of pathogenic bacteria. CD, after entering the host organism, subsequently produces toxins that are damaging the intestine and leads to severe diarrhea and inflammation. The most commonly applied method of treatment is antibiotic therapy. However, first CD strains resistant to the first-line antibiotics employed to combat the CD infection have been described. Moreover, the antibiotic treatment is expensive and causes prolonged patient stay in the hospital. Consequently, research into new treatments and prevention of CD infections is absolutely necessary.

This dissertation describes novel, immunoreactive CD proteins that can be exploited as vaccine antigens or, on the second hand, employed in the production of therapeutic antibodies. One of these proteins, that is the Cwp22 protein, was subjected to detailed mapping in order to determine its epitopes. The process of confirming epitopes for their vaccine application has been described. The immunoreactive peptides of the Cwp22 protein conjugated to a carrier protein were used to examine the properties of the new mucosal adjuvant. As part of this work, a set of nanoadjuvants with diverse physicochemical and biological properties was formulated and characterized. Their adjuvant properties were confirmed in *in vivo* studies.

The efforts presented in this work are comprehensive and can also be utilized in the case of other infections. For example, the nanoadjuvant characterized in this work can be successfully used for other antigens. The work initiated in this dissertation will be sustained.

This doctoral dissertation was supported by two scientific grants awarded by the National Science Center (OPUS 2016/21 / B / NZ6 / 02286, PRELUDIUM 2015/17 / N / NZ6 / 03512).

3. Wykaz skrótów

Skrót	rozwińnięcie angielskie	rozwińnięcie polskie
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>	5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan
BDMDDAC	<i>benzyltrimethylammonium chloride</i>	
BDMHDAC	<i>benzyltrimethylhexadecylammonium chloride</i>	
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>	makrofagi izolowane ze szpiku kostnego
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	albumina surowicy krwi wołowej
CBP	<i>cetylpyridinium bromide hydrate</i>	bromek cetylopirydynowy
CD	<i>Clostridium difficile</i>	
CDI	<i>Clostridium difficile infection</i>	zakażenie <i>Clostridium difficile</i>
CDT	<i>Clostridium difficile binary toxin</i>	toksyna binarna <i>Clostridium difficile</i>
CPC	<i>cetylpyridinium chloride</i>	chlorek cetylopirydynowy
CTMAC	<i>cetyltrimethylammonium chloride</i>	chlorek cetylotrójmetyloamoniowy
CWP	<i>cell wall proteins</i>	białka ściany komórkowej
DLS	<i>dynamic light scattering</i>	dynamiczne rozpraszanie światła
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>	Dimetylosulfotlenek
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	test immunoenzymatyczny
ELS	<i>electrophoretic light scattering</i>	elektroforetyczne rozpraszanie światła
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Agencja Żywności i Leków
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>	tkanka limfatyczna związana z jelitami
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

GTP	<i>guanosine triphosphate</i>	guanozyno-5-trifosforan
HMW	<i>high molecular weight</i>	duża masa cząsteczkowa
IFN	<i>Interferon</i>	Interferon
IL	<i>Interleukin</i>	Interleukina
IN	<i>Intranasal</i>	donosowo
IM	<i>Intramuscular</i>	domięśniowo
ISCOM	<i>immune-stimulating complex</i>	kompleks immunostymulujący
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>	hemocyjanina skałoczeпа
LMW	<i>low molecular weight</i>	niska masa
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisacharyd
MALT	<i>mucosal-associated lymphoid tissue</i>	tkanka limfatyczna związana ze śluzówką
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	główny układ zgodności tkankowej
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>	białko zapalne makrofagów
MPL	<i>monophosphoryl lipid A</i>	monofosforylowany lipid A
NAC	<i>nanoadjuvant candidate</i>	potencjalny nanoadiuwant
NALT	<i>nasal-associated lymphoid tissue</i>	tkanka limfatyczna związana z jamą nosową i gardłem
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>	błękit nitrotetrazolowy
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i>	domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotydy
OVA	<i>Ovalbumin</i>	Owalbumina
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	buforowany roztwór soli fizjologicznej
PDI	<i>polydispersity index</i>	wskaźnik dyspersyjności
PDMS	<i>polydimethylsiloxane</i>	polidimetylosiloksan

PG	<i>Peptidoglycan</i>	peptydoglikan
PLGA	<i>poly(lactic-coglycolic) acid</i>	kopolimer kwasu mlekowego, glikolowego i kaprolaktanu
QS21	<i>Quillaja saponaria-21</i>	
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>	(chemokina) regulowana przez aktywację, ekspresjonowana i wydzielana przez prawidłowe limfocyty T
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>	laurylosiarczan sodu
SLP	<i>S-layer protein</i>	białko warstwy S
SPF	<i>specific pathogen free</i>	wolny od patogenów
SRB	<i>sulforhodamine B</i>	sulforodamina B
sIgA	<i>secretory antibodies class A</i>	wydzielnicze przeciwciała typu A
TBS	<i>tris-buffered saline</i>	roztwór soli fizjologicznej buforowany solą trisu
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>	kwas trichlorooctowy
TLR	<i>toll-like receptor</i>	receptor toll-podobny
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	czynnik martwicy nowotworu

4. Wstęp

Badania zebrane w niniejszej rozprawie doktorskiej mają na celu opracowanie prototypowej szczepionki dośluzówkowej przeciwko *Clostridium difficile* (syn. *Clostridioides difficile*) (CD). CD to bakteria atakująca głównie osoby w podeszłym wieku w trakcie hospitalizacji i po licznych kuracjach antybiotykowych. Przedstawione w niniejszej pracy rozwiązania mogą posłużyć do stworzenia w przyszłości szczepionki do samodzielnej aplikacji przez pacjenta (pod nadzorem lekarza), przykładowo przed planowanym zabiegiem w szpitalu. Rozprawa składa się z trzech części. Pierwsza, opisuje prace związane z nowymi antygenami szczepionkowymi CD. Kolejna, dotyczy prac nad nowym adiuwantem dośluzówkowym, czyli nanoadiuwantem. Ostatnia część dotyczy charakterystyki właściwości przykładowej formułacji złożonej z koniugatów zawierających immunoreaktywne peptydy CD i nanoadiuwanta. Wyniki uzyskane w toku pracy mają charakter aplikacyjny oraz są przedmiotem trzech zgłoszeń patentowych.

4.1. Immunologia śluzówki

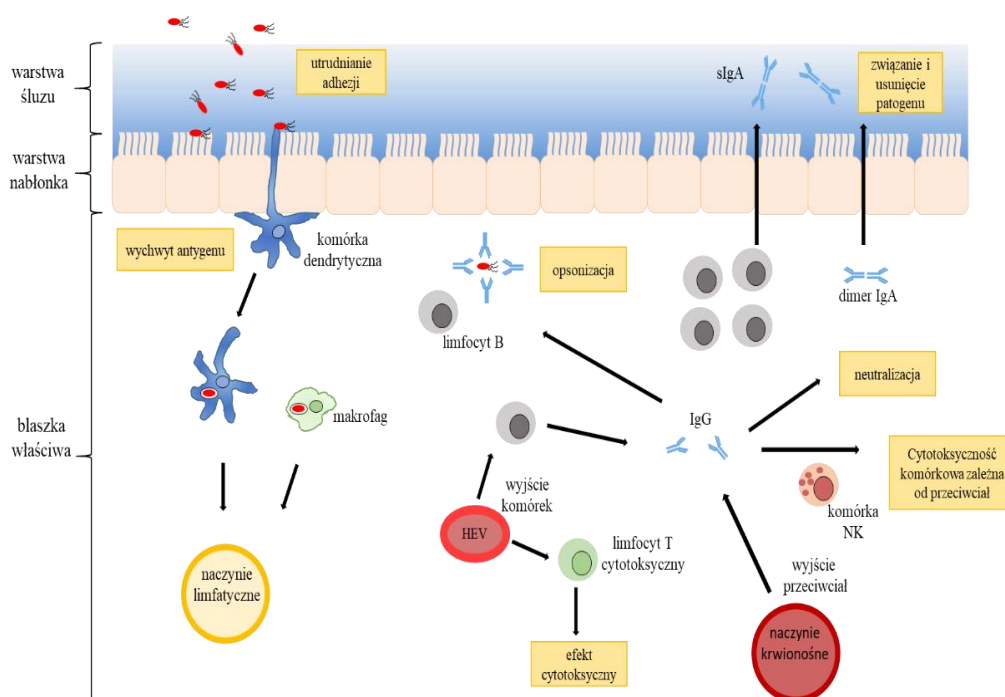
Błona śluzowa (śluzówka) to wyściółka przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowo-płciowego oraz rogówki oka, która ochrania organizm przed patogenami i wzbudza tolerancję względem mikroorganizmów tworzących naturalną mikroflorę człowieka. Powierzchnia śluzówki człowieka jest 200 razy większa niż powierzchnia skóry i sięga nawet 400 m² [1]. Śluzówka składa się z dwóch warstw, nabłonka i znajdującej się pod nim tkanki łącznej, zwanej też blaszką właściwą zawierającą naczynia krwionośne, limfatyczne, nerwy, gruczoły i mięśnie gładkie. Śluzówka to pierwsze miejsce kontaktu z czynnikami, takimi jak: alergen, pożywnienie i różnego rodzaju drobnoustroje. Ponad 90% zakażeń człowieka ma swój początek właśnie na śluzówce [2]. Patogen może kolonizować śluzówkę lub użyć jej, jako „drzwi” do wnętrza organizmu. Śluzówka, zatem bywa nazywana pierwszą linią obrony organizmu przed zakażeniami. Nie jest to jednak jej jedyna rola. Pełni ona również bardzo ważną funkcję w rozpoznaniu czynników zewnętrznych kontaktujących się z błoną śluzową – wskazuje, które z nich są potencjalnie niebezpieczne, a które nieszkodliwe [3]. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie powyższego balansu ma kluczowe znaczenie w procesie projektowania szczepionki dośluzówkowej.

U zdrowego człowieka, śluzówka zawiera 80% wszystkich komórek układu odpornościowego [3], a komórek produkujących przeciwciała jest tu więcej niż we wszystkich pozostałych organach biorących udział w odpowiedzi immunologicznej,

takich jak: węzły chłonne, śledziona czy szpik kostny [4]. Jest to bardzo złożony system, a jego funkcja zależy od odpowiedniej indukcji limfocytów tkanki limfatycznej powiązanej z błonami śluzowymi MALT (z ang. *Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*). MALT, ze względu na lokalizację i pełnione zadania dzieli się na tkankę limfatyczną powiązaną z błonami śluzowymi nosa i płuc NALT (z ang. *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*), układu pokarmowego GALT (z ang. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) i układu moczowo-płciowego. Każda z tych tkanek jest unikalna i działa niezależnie od pozostałych. Każda z nich jest również związana z systemowym układem limfatycznym, przez co odpowiedź odpornościowa indukowana na śluzówce może wyzwać odpowiedź odpornościową całego organizmu. Ten proces rzadko odbywa się jednak w odwrotną stronę – indukcja odpowiedzi systemowej w niewielu przypadkach wzbudza odpowiedź śluzówkową. Pomimo, że tkanki układu limfatycznego powiązane z błoną śluzową pełnią odrębne funkcje w odległych rejonach organizmu, są w stanie się ze sobą „kontaktować”. Przykładowo, indukcja odpowiedzi odpornościowej w NALT może wpływać na odpowiedź w GALT. Fenomen ten nazywany jest wspólnym układem odpornościowym błon śluzowych [4]. Podsumowując, indukcja odpowiedzi na śluzówce, na przykład przez szczepionkę donosową, może pobudzać nie tylko odpowiedź w rejonie szczepienia, ale i w odległych rejonach śluzówki (układ rozrodczy, pokarmowy) oraz odpowiedź systemową organizmu.

Mechanizmy broniące organizm przed patogenami działające w obrębie śluzówki dzielą się na nieswoiste (wrodzone) oraz swoiste (adaptywne) i zostały zebrane na **Rysunku 1**. Szczepionka dośluzówkowa, aby była efektywna, musi przedostać się przez te same linie obrony co patogen. Do wrodzonych mechanizmów obronnych zalicza się nabłonek, działający jako fizyczna bariera chroniąca przed dostępem do wnętrza organizmu i pokrywające go wydzieliny gruczołów, bogate w mucynę oraz białka o działaniu przeciwbakteryjnym. Komórki Gobleta (komórki kubkowe) znajdujące się w nabłonkach produkują bardzo duże ilości glikoproteiny, która tworzy grubą, naładowaną elektrostatycznie warstwę śluzu. Śluz i silne połączenia międzykomórkowe łączące komórki nabłonka są głównymi barierami broniącymi przed dostępem patogenów do wnętrza organizmu. Antygeny, które dostają się do organizmu, na przykład wziewnie, zostają zawieszane w śluzie, a następnie są usuwane z jamy nosowej poprzez ruchy urzęsionych komórek nabłonka nosa przesuujących śluz w stronę układu pokarmowego. Ciągły transport śluzu i zawieszonych w nim patogenów zapobiega ich przywieraniu do komórek nabłonka oraz skraca czas przebywania antygeny na śluzówce,

co utrudnia inwazję. Nie jest to jedyny mechanizm, jakim dysponuje organizm w walce z patogenami. W śluzie, zawieszane są enzymy trawienne, takie jak: hydrolazy (proteazy, lipazy, nukleazy), laktoferyna i peroksydazy, które szybko doprowadzają do zniszczenia wprowadzonych antygenów, a dodatkowo komórki Panetha, obecne w jelicie cienkim, produkują lizozym, fosfolipazę A2 typu II i α -defensyny [5]. Do mechanizmów chroniących śluzówkę zalicza się również komórki układu odpornościowego zawieszane w śluzie, aktywnie atakujące drobnoustroje, takie jak: monocyty, makrofagi, neutrofile i eozynofile. Te komórki, dzięki receptorom Fc obecnym na ich powierzchni, rozpoznają „naznaczone” poprzez opsonizację cele do zniszczenia. Dodatkowo, uwalniają duże ilości cytokin działających jak sygnały alarmowe, które powodują napływ innych komórek układu odpornościowego. Wprowadzane do organizmu szczepionki również powinny pobudzać te komórki do działania przez indukcję sygnałów niebezpieczeństwa (z ang. *danger signals*). Dodatkowo, komórki nabłonka rozpoznają niebezpieczne składniki mikroorganizmów poprzez receptory rozpoznające wzorce, np. przez błonowe receptory Toll-podobne. Receptory Toll-podobne w odpowiedzi na elementy patogenu wysyłają sygnały oparte o chemokiny i cytokiny do niżej położonych komórek śluzówkowego układu odpornościowego, takich jak komórki dendrytyczne czy makrofagi celem uruchomienia dalszej odpowiedzi nieswoistej oraz zainicjowania odpowiedzi swoistej [6].



Rysunek 1 Mechanizmy obronne śluzówki. Czerwone owale reprezentują patogeny. Użyte skróty: HEV – żyłki o wysokim śródbłonku, NK – naturalni zabójcy (z ang. *natural killers*), sIgA – wydzielnicze przeciwciała klasy A, IgG – przeciwciała klasy G.

Indukcja odpowiedzi śluzówkowej przeciwko obcym antygenom, zachodzi w obecności zorganizowanej tkanki limfatycznej w śluzówce lub w węzłach chłonnych [7], w miejscach najbardziej prawdopodobnego kontaktu z patogenem (migdałki podniebienne, migdałki językowe) oraz w miejscach nagromadzenia bakterii (dolna część układu pokarmowego). U ludzi, zorganizowane grudki limfatyczne tworzą kępkę Peyera zlokalizowane w błonie śluzowej i podśluzowej jelita krętego oraz liczne samodzielne grudki chłonne w jelicie i odbycie [8]. Nad miejscami, w których zlokalizowane są te struktury, tkanka nabłonkowa tworzy wyspecjalizowaną strukturę zwaną nabłonkiem towarzyszącym grudkom, w którym znajdują się komórki M [9]. Komórki M są wyspecjalizowane w endocytozie i transporcie przez błonę nienaruszonych antygenów i to te komórki są głównym celem antygenów szczepionkowych. Komórki M tworzą kieszonki, do których migrują limfocyty B i T oraz czasami komórki dendrytyczne. W tych kieszonkach dochodzi do przekazania antygeny limfocytom i komórkom dendrytycznym, a następnie jego dalsze przetwarzanie. Nabłonek towarzyszący grudkom jest inny pod względem morfologicznym niż ten wyściełający jelita, gdyż jego funkcją jest gromadzenie limfocytów i komórek dendrytycznych z udziałem chemokin [10].

Antygeny pobrane przez komórki M zostają przekazane niedojrzałym komórkom dendrytycznym, które następnie migrują do regionów kępki Peyera bogatych w limfocyty T, gdzie w procesie dojrzewania, ekspresji ulegają antygeny powierzchniowe, takie jak CD40, CD11c, czy cząsteczki MHC [11,12]. Niektóre z nich wędrują do węzłów chłonnych, gdzie dochodzi do kontaktu z systemowym układem immunologicznym.

Pobór antygeny przez komórki układu odpornościowego, na przykład ze światła jelita albo jamy nosowej, jest możliwy również w przypadku braku śluzówkowej zorganizowanej tkanki limfatycznej. Proces ten zachodzi przy udziale komórek nabłonkowych i komórek dendrytycznych (**Rysunek 1**). Komórki dendrytyczne migrują do wąskich przestrzeni pomiędzy komórkami nabłonka, gdzie mogą pobierać antygeny bezpośrednio ze światła jelita lub jamy nosowej [13]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku regionów śluzówki, w których nie ma zorganizowanych grudek limfatycznych i komórek M, czyli np. w układzie rozrodczym. Komórki dendrytyczne, które pobrały antygen mogą współpracować z limfocytami celem stymulacji pamięci immunologicznej lub tolerancji, mogą również opuścić śluzówkę przez naczynia limfatyczne i migrować, przykładowo do węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygen naiwnym limfocytom T [14]. Podsumowując, ułatwienie poboru antygeny szczepionkowego przez komórki nabłonkowe i dendrytyczne, może znacznie poprawiać efektywność szczepionki.

Pośrednikami swoistej śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej są wydzielnicze przeciwciała typu A (sIgA), które zapobiegają kolonizacji śluzówki przez patogeny. Dzięki temu, uniemożliwiają dotarcie patogenów do głębszych warstw nabłonka i tym samym zatrzymują rozwój choroby. Dimery i multimery, tworzone przez przeciwciała typu sIgA, są dużo bardziej odporne na działanie proteaz niż inne klasy przeciwciał. Wynika to z ich silnej glikozylacji, która zachodzi w trakcie ich produkcji przez komórki plazmatyczne [6]. sIgA, poprzez związanie patogenu, doprowadzają do jego „uwięzienia” w śluzie, zapobiegając bezpośredniemu kontaktowi z nabłonkiem. Następnie, specyficzne przeciwciała sIgA blokują receptory powierzchniowe patogenów uniemożliwiając im wiązanie się do nabłonka [15]. sIgA, które znajdują się pod powierzchnią nabłonka, mogą transportować opłaszczony patogen do światła jelita lub doprowadzać do śmierci już zakażonych komórek [16]. Oprócz przeciwciał klasy IgA również przeciwciała klasy IgG mogą być produkowane lokalnie, na śluzówce, po pojawieniu się antygeny [6]. W literaturze, opisano występowanie dużych ilości komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała IgG w kobiecym układzie rozrodczym,

a wysokie stężenia przeciwciał IgA i IgG oznaczono w wydzielinach szyjki macicy i pochwy [17]. IgG mogą występować lokalnie również w jelicie, ale ich stężenie jest od 30 do 100 razy mniejsze niż sIgA [18]. Wynika to z faktu, że IgG są mniej odporne na degradację w wyniku działania proteaz, zarówno bakteryjnych jak i tych pochodzących od gospodarza. Nie mniej jednak, przeciwciała IgG również mogą neutralizować patogeny atakujące śluzówkę.

W odpowiedzi immunologicznej śluzówki istotną rolę odgrywa odpowiedź komórkowa. Ten typ odpowiedzi oraz działanie wydzielniczych IgA bardzo dobrze się uzupełniają. Przykładowo, cytotoksyczne limfocyty T rozpoznają peptydy pochodzące od białek rdzeniowych patogenów, jak na przykład wirusa grypy. Białka te zwykle są ekspresjonowane i prezentowane znacznie wcześniej niż białka rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące, takie jak hemaglutynina czy neuraminidaza wirusa grypy. Zatem odpowiedź komórkowa następuje znacznie wcześniej niż indukcja przeciwciał i tworzy jedną z pierwszych linii obrony. Komórki cytotoksyczne mogą być klasyfikowane na te działające niespecyficznie i specyficznie względem antygeny. Do pierwszej grupy należą komórki NK (z ang. *Natural Killers*), które działają na bardzo wczesnym etapie zakażenia (dzień 1-3). Komórki drugiej grupy zaczynają działać później (dzień 3 – 5) [19]. Oba typy komórek reagują na patogen poprzez produkcję cytokin, takich jak IFN- γ , TNF- α i chemokin, takich jak Rantes, MIP-1 α i MIP-1 β [20,21]. Te czynniki hamują wzrost patogenów wewnątrzkomórkowych, którymi są wirusy, ale bez niszczenia komórek własnych organizmu. Następnie, komórki cytotoksyczne rozpoznają i niszczą zainfekowane komórki, przez co zapobiegają namnażaniu się wirusów.

Poza mechanizmami obronnymi opisanymi powyżej, istnieją również mechanizmy tolerancji śluzówkowej, które istotnie wpływają na efektywność szczepionki. W przypadku naturalnej mikroflory, na przykład w jelicie, komórki nabłonkowe, wraz z obecnymi pomiędzy nimi i pod nimi komórkami fagocytykującymi, mogą modulować i tłumić sygnały pochodzące od własnej mikrobioty. Zapobiega to nadmiernemu pobudzeniu odpowiedzi odpornościowej i wywołaniu przewlekłego stanu zapalnego, na przykład, jak w przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna [22,23]. Procesy tolerancji śluzówkowej przeciwdziałają nadreaktywności systemu względem nieszkodliwych antygenów [24]. To czy dany antygen, wywoła odpowiedź immunologiczną czy tolerancję zależy w głównej mierze od dawki i czasu trwania jego kontaktu ze śluzówką. Tolerancja może zostać wywołana przy długotrwałym kontakcie antygeny podanego w niskich dawkach lub w przypadku podania wysokiej jednorazowej

dawki antygeny, która doprowadza do swoistego przytłoczenia układu immunologicznego [25]. Istnieje kilka mechanizmów tolerancji. W przypadku układu pokarmowego, dostarczenie wysokich dawek antygeny, prowadzi do powstania tolerancji na drodze delecji klonalnej (usunięcie przez apoptozę reagujących na antygen limfocytów) lub anergii (wprowadzenie limfocyty w stan „uśpienia”) [26,27]. W przypadku niskich dawek antygeny, tolerancja zachodzi w wyniku działania limfocytów T regulatorowych [28]. W układzie oddechowym, w przypadku wysokich dawek antygeny, również dochodzi do indukcji tolerancji na drodze anergii [29], a gdy podawane są niskie dawki rozpuszczalnych antygenów, wtedy zaistniała tolerancja jest wynikiem polaryzacji immunologicznej, czyli różnicowania limfocytów w stronę limfocytów Th1 [30]. Do anergii dochodzi w momencie, gdy limfocyty T rozpoznały antygen, ale nie otrzymały dodatkowego sygnału stymulującego. Te limfocyty, w odpowiedzi na antygen, nie namnażają się i nie produkują IL-2. Delecja klonalna prowadzi do apoptozy specyficznych względem antygeny limfocytów Th1 i Th2. Mechanizm, w którym biorą udział limfocyty T-regulatorowe, polega na blokowaniu przez nie proliferacji populacji limfocytów specyficznych względem antygeny [31]. Z powyższego opisu wynika, że odpowiedni dobór dawki jest kluczowy w procesie projektowania szczepionki dośluzówkowej.

Podsumowując, wprowadzona do organizmu szczepionka musi sprostać zarówno aparatom obronnym śluzówki jak i wzbudzać dostatecznie silną odpowiedź bez jednoczesnej indukcji tolerancji. W zależności od wybranej drogi podania szczepionki, repertuar tych mechanizmów jest inny i musi być brany pod uwagę w procesie projektowania szczepionki. Co więcej, droga podania oraz rodzaj zastosowanego nośnika również wpływają na efektywność i rodzaj wzbudzonej odpowiedzi.

4.2. Szczepionki

Szczepionka jest to preparat biologiczny, którego stosowanie ma na celu wzbudzenie odporności względem specyficznego mikroorganizmu. Dostępne na rynku szczepionki dzieli się na cztery grupy: szczepionki atenuowane, czyli oparte na żywych, ale osłabionych mikroorganizmach; szczepionki oparte na zabitych mikroorganizmach; szczepionki podjednostkowe, czyli złożone z wyizolowanych z patogenów i oczyszczonych antygenów; ostatni rodzaj to szczepionki, w których znajdują się toksyny produkowane przez mikroorganizmy. Obecnie odchodzi się od zastosowania

w szczepionkach całych organizmów, ze względu na możliwość wywołania choroby u szczepionego pacjenta. Dodatkowo, szczepionki podjednostkowe mają wiele zalet: brak ryzyka rozwinięcia się zakażenia poszczepiennego w wyniku ich zastosowania, obniżenie prawdopodobieństwa wystąpienia działań niepożądanych, możliwość stosowania preparatu o ściśle określonym składzie [32]. W nowoczesnych szczepionkach skojarzonych znajdują się składniki należące do wszystkich powyższych grup. Szczepionki mogą być stosowane parenteralnie w postaci zastrzyku lub dośluzówkowo czyli, na przykład doustnie, donosowo, dopochwowo itd. (**Tabela 1**) [33].

Szczepionki podawane drogą parenteralną są zwykle słabymi induktorami odpowiedzi odpornościowej na śluzówce [34]. Przewagą tych szczepionek jest dokładnie określona ilość podanego antygeny i łatwość oszacowania odpowiedzi organizmu na szczepienie poprzez zbadanie poziomu specyficznych przeciwciał krążących w krwi pacjenta. W przypadku szczepionek przeznaczonych do podania dośluzówkowego, jest to znacznie utrudnione. Niewiele tego typu szczepionek zostało dopuszczonych do zastosowania u ludzi. Niemniej jednak, szczepionki dośluzówkowe mają bardzo duży potencjał praktyczny wynikający z ułatwionego podania i produkcji, braku pozostałych po szczepieniu groźnych odpadów medycznych oraz mniejszych obostrzeń prawnych przy wprowadzaniu na rynek. Dodatkowo, takie szczepionki mogą zostać podane przez osobę bez przeszkolenia medycznego, co może ułatwić, np. walkę z pandemią grypy, masowe szczepienia w krajach rozwijających się lub też immunizację w wypadku biologicznego ataku terrorystycznego [35,36].

Idealna szczepionka powodowałaby, że podanie jedną drogą indukowałoby zarówno odpowiedź komórkową jak i humoralną, i to nie tylko na śluzówce, ale w całym organizmie. Pod tym kątem podanie donosowe i podjęzykowe zdają się być najbardziej obiecujące (**Tabela 1**).

Tabela 1 Porównanie dróg podania szczepionki.

Droga podania	Miejsce indukcji przeciwciał IgA	Indukcja limfocytów T cytotoksycznych	Czy jest odpowiedź systemowa?	Uwagi	Ref.
Parenteralna	rzadko: gruczoł sutkowy, ślinianki, układ pokarmowy	Tak	tak		[37]
Donosowa	ślinianki, górne i dolne drogi oddechowe, układ rozrodczy, jelito cienkie i grube	Tak	tak	możliwe interakcje z układem nerwowym	[17,38–40]
Doustna	układ pokarmowy, ślinianki, gruczoły sutkowe	Tak	tak	silny mechanizm tolerancji, degradujące środowisko	[41–43]
Podjęzykowa	górne i dolne drogi oddechowe, układ pokarmowy, układ rozrodczy	Tak	tak		[44–46]
Przezsórnna	górne i dolne drogi oddechowe, słaba odpowiedź w układzie pokarmowym	Tak	tak	konieczność zastosowania mikroigieł	[2,47]
Doodbytnicza	jelito grube, odbył, układ rozrodczy	Tak	bardzo słaba		[2,48]
Dopochwowa	układ rozrodczy	brak danych	bardzo słaba	immunizacja zależna od fazy cyklu	[2,17]

Szczepionki wyzwalające zarówno odpowiedź śluzówkową jak i systemową, to te podawane doustnie, donosowo, podjęzykowo i przezskórnie. Szczepionki doustne stanowią największe wyzwanie dla ich twórców. Problemem jest nie tylko wysoce niesprzyjające środowisko układu pokarmowego, w którym działają niszczące enzymy trawienne ale i silnie działający mechanizm tolerancji. Takie szczepionki, aby zadziałać, muszą przedostać się przez barierę śluzówki w odpowiednio dużym stężeniu, celem wywołania odpowiedzi immunologicznej bez jednoczesnego wzbudzenia mechanizmu tolerancji [49,50]. Dostępna jest bogata literatura na temat udanych szczepionek testowanych doustnie u zwierząt, jednak wyniki badań klinicznych rozczarowują. Co prawda, istnieją efektywne szczepionki doustne, takie jak te przeciwko rotawirusom lub cholercze, ale nadal brakuje wiedzy na temat tego, dlaczego jedne szczepionki doustne działają a inne nie. Modyfikacja tych formułacji, poprzez zastąpienie antygeny innym bez zmiany reszty składników, nie przyniosła oczekiwanych efektów [41]. Niestety, szczepionki doustne mogą mieć słabsze działanie u osób z krajów rozwijających się ze względu na ich niedożywienie, zaburzoną mikroflorę jelitową i schorzenia towarzyszące [42].

Odpowiedź immunologiczna przy podaniu podjęzykowym szczepionki jest podobna do tej w przypadku podania donosowego. Takie szczepienie rozpuszczalnymi, jak i cząsteczkowymi antygenami, indukuje odpowiedź humoralną w postaci śluzówkowych IgA i systemowych IgG oraz cytotoksycznych limfocytów T [44,45]. Immunizacja podjęzykowa przeciwko wirusowi brodawczaka i *Chlamydia muridarum* zapobiegała infekcji tymi patogenami. Ten sam sposób podania był również efektywny w przypadku immunizacji przeciwko *Helicobacter pylori* czy *Vibrio cholerae* [51,52]. Warto podkreślić, że tym przypadku, dawka antygeny jest mniejsza niż przy podaniu doustnym [51]. Obecnie trwają badania kliniczne nad szczepionkami podawanymi podjęzykowo.

Podanie przezskórne szczepionki wyzwała odpowiedź immunologiczną w górnych i dolnych drogach oddechowych, słabą w układzie pokarmowym oraz odpowiedź systemową [2,47]. Dużym utrudnieniem w szczepieniu przezskórnym jest konieczność zastosowania wyrafinowanych systemów aplikacji, które umożliwiłyby penetrację wierzchnich, martwych warstw naskórka. Do takich systemów należą mikroigły, zastosowanie sonoforezy, czy jonoforezy [53]. Wszystkie powyższe znacznie zwiększają koszty szczepienia oraz utrudniają sam proces aplikacji szczepionki.

Podanie donosowe indukuje odpowiedź immunologiczną w NALT, śluzówce układu pokarmowego, układzie oddechowym i rozrodczym, a także odpowiedź systemową [54]. Szczepionka przeciwko grypie (FluMist, MedImmune), zawierająca atenuowanego wirusa, podawana donosowo okazała się bardzo efektywna [55]. Podobnie zakończyły się próby podania donosowego szczepionki przeciwko *Shigella flexneri*, patogenu atakującego układ pokarmowy [56]. Donosowo stosuje się mniejsze porcje antygeny i adiuwantu w porównaniu do, na przykład podania doustnego. Ze względu na liczne zalety tej drogi administracji szczepionki i udane próby immunizacji ten typ podania szczepionki zostanie szerzej zbadany w dalszej części pracy.

Szczepionki podane dośluzówkowo natrafiają na te same mechanizmy obronne, co atakujące organizm patogeny, czyli: zostają rozcieńczone i unieruchomione w śluzie, są atakowane przez proteazy i nukleazy, zostają oddzielone od wnętrza organizmu szczelną barierą nabłonka. Ze względu na powyższe, potrzeba dużej dawki szczepionki aby immunizacja była efektywna. Co więcej, niemożliwym jest określenie jak duża jej część trafia do komórek układu odpornościowego. Rozpuszczalne, nieadherentne antygeny są pobierane w bardzo małym stopniu i często wzbudzają tolerancję zamiast odpowiedzi [57]. Wydaje się, że opisane utrudnienia mogą zostać przezwyciężone dzięki zastosowaniu odpowiednich adiuwantów. Najlepiej takich, które by wiązałyby się do powierzchni śluzówki, a najlepiej do komórek M, stymulowały mechanizmy wrodzonej odporności i wzbudzały odpowiedź adaptacyjną specyficzną względem patogenu. Obecnie trwają badania nad takimi adiuwantami.

4.2.1. Adiuwanty

Adiuwant to składnik szczepionki, który wzmacnia odpowiedź humoralną i komórkową organizmu na antygen. Ma szczególne znaczenie w przypadku szczepionek opartych o inaktywowane patogeny czy elementy izolowane z mikroorganizmów (szczepionki podjednostkowe), gdyż te same w sobie są niewystarczająco immunogenne. Adiuwant powinien być stabilny aż do momentu jego zastosowania, a jednocześnie ulegający biodegradacji, dzięki czemu zostaje usunięty z organizmu po zakończeniu procesu szczepienia. Ponadto, powinien być sam w sobie obojętny immunologicznie, tani w produkcji, a w połączeniu z antygenem powinien indukować odpowiedni rodzaj odpowiedzi odpornościowej [58]. Wyróżniamy co najmniej kilka opisanych mechanizmów działania adiuwantów. Adiuwant może działać poprzez efekt „depot”,

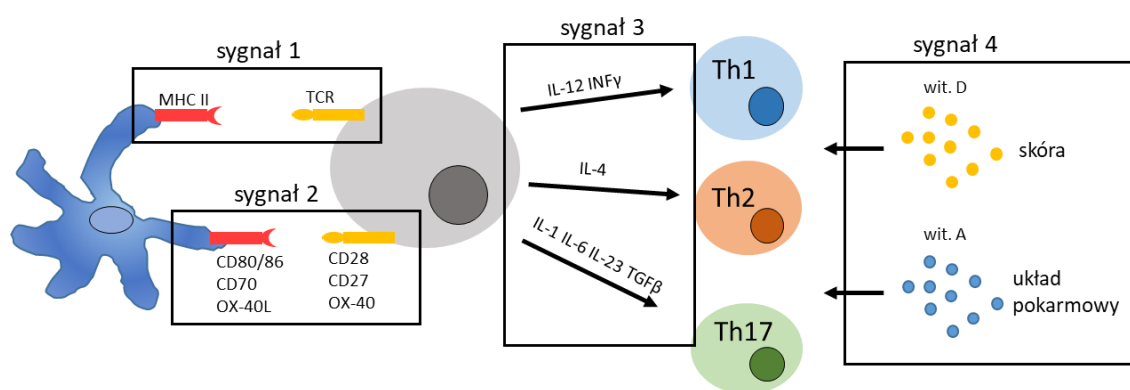
czyli tworzenie swoistego rezerwuaru, z którego antygen uwalniany jest bardzo powoli, przez co wydłuża się czas jego kontaktu z komórkami układu odpornościowego; ułatwianie transportu antygeny i jego prezentacji komórkom immunokompetentnym; w połączeniu z antygenem umożliwia aktywację/modulację odpowiedzi immunologicznej i indukcję limfocytów T-cytotoksycznych [59]. Różnorodne substancje i związki mogą mieć działanie adiuwantowe, są to, na przykład produkty pochodzenia mikrobiologicznego, sole mineralne, emulsje, mikrocząstki i liposomy. W ciągu ostatniego stulecia zaproponowano wiele adiuwantów, ale tylko nieliczne zostały przetestowane w badaniach klinicznych. Z tego tylko pięć adiuwantów zostało dopuszczonych do użycia u człowieka przez U.S. Food and Drug Administration (Amerykańska Agencja Żywności i Leków), a są to: związki glinu, AS03, MF59™, wirosomy i AS04 [60]. Wszystkie z nich służą do podania parenteralnego. Związki glinu są najpowszechniej używanymi adiuwantami w szczepionkach przeznaczonych do stosowania u ludzi [61]. AS04, MF59™ i wirosomy są stosowane w szczepionkach przeciwko grypie. AS04 znajduje się w szczepionkach przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B oraz przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego [62]. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za powstanie odpowiedzi odpornościowej w rejonie immunizacji pozwala na zaprojektowanie odpowiedniego adiuwantu dla konkretnego rodzaju szczepionki.

Wydaje się, że w procesie szczepienia największą rolę pełnią komórki dendrytyczne, które zostały nazwane naturalnymi adiuwantami [63]. Komórki dendrytyczne są wyspecjalizowane w prezentacji antygeny, regulują siłę i rodzaj odpowiedzi oraz pamięć immunologiczną. Komórki dendrytyczne rozpoznają obce antygeny, tworzą z nich krótkie peptydy, które prezentują za pomocą cząsteczek MHC receptorom limfocytów T. Następnie, przy udziale dodatkowych cząsteczek kostymulujących, aktywują naiwne limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$ [64]. Komórki $CD4^+$ wspomagają limfocyty B w produkcji określonej klasy przeciwciał i powstanie długo żyjących komórek plazmatycznych produkujących specyficzne względem antygeny przeciwciała [65]. Komórki dendrytyczne mogą zostać aktywowane przez patogeny na dwa sposoby. Po pierwsze, komórki dendrytyczne mogą rozpoznawać intruza za pomocą receptorów rozpoznających wzorce patogenów, takie jak endotoksyny, peptydoglikan lub niemetylowane motywy CpG poprzez receptory TLR. Po drugie, może się to odbywać pośrednio poprzez kontakt z wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem tkanek przez atakujące patogeny, takie jak: kwas moczowy, adenozyno-5-trifosforan lub

białkami związanymi z chromatyną [63]. Następnie, dojrzałe komórki dendrytyczne aktywują komórki T poprzez dostarczenie im maksymalnie czterech sygnałów aktywacji (**Rysunek 2**). Co najmniej dwa sygnały są niezbędne do aktywacji naiwnych limfocytów T i komórek pamięci [66]. Pierwszy sygnał to wynik oddziaływania receptora TCR na powierzchni limfocytów T z cząsteczką MHC z komórki dendrytycznej, na której znajduje się peptyd pochodzący od antygeny, np. białka patogennej bakterii. W ten sposób limfocyt T jest pobudzany, ale do jego pełnej aktywacji brakuje sygnału drugiego, czyli kontaktu dodatkowych receptorów z limfocytu T (np. CD28, OX-40, CD27) z receptorami na powierzchni komórki dendrytycznej (np. CD80, CD86, OX-40L, CD70). W wyniku tych oddziaływań dochodzi do ekspansji klonalnej aktywowanych limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ [66,67]. Zadziałanie jedynie sygnału pierwszego, bez dodatkowej stymulacji, prowadzi do powstania wcześniej wspomnianej tolerancji [68]. Po zadziałaniu dwóch sygnałów, limfocyty T CD4⁺ są aktywowane, ale nadal nie mają określonej polaryzacji, więc opisuje się je jako CD4⁺ Th0. Do ich polaryzacji niezbędny jest sygnał trzeci otrzymany od dojrzałych komórek dendrytycznych (dodatkowo stymulowanych przez eozynofile i komórki tuczne) poprzez cytokiny i inne cząsteczki obecne na powierzchni tych komórek [69]. Efektem tego jest polaryzacja komórek Th0 w stronę komórek efektorowych typu Th1, Th2, Th9, Th17 lub Th22, których działanie jest specyficzne względem konkretnych zagrożeń [69]. Sygnał trzeci jest również niezbędny do powstania komórek cytotoksycznych CD8⁺ [70]. Efektorowe komórki T są już zdolne i gotowe do działania, ale potrzebują jeszcze sygnału czwartego, który pokieruje je do miejsca, w którym mają zadziałać. Takim sygnałem są produkowane przez komórki dendrytyczne witaminy, jak A i D. W odpowiedzi na te witaminy, limfocyty T efektorowe, włączają ekspresję receptorów dla chemokin CCR9 [71] i CCR10 [72]. Pojawienie się tych chemokin w środowisku instruuje limfocyty T efektorowe do migracji odpowiednio w stronę jelit lub skóry.

W przypadku szczepienia, odpowiedź ochronna względem patogenu jest wzbudzana w sposób nienaturalny, ale naśladujący proces naturalnego zakażenia. Dlatego też, w szczepionce, powinny znaleźć się związki wzmacniające i modulujące odpowiedź immunologiczną, takie jak adiuwanty [73,74]. Pomimo braku jednoznacznych dowodów, uważa się, że do grupy adiuwantów wzmacniających sygnał 1 należą emulsje typu woda w oleju, mikroemulsje typu olej w wodzie, alum, sole wapnia, liposomy oraz szeroka grupa polimerów. Związki te wydłużają okres przebywania antygeny w miejscu podania, przez co przedłużają czas jego prezentacji. Wszystkie

adiuwanty, które będą zwiększały rekrutację komórek prezentujących antygen, jak również promowały prezentację, przetwarzanie i kierowanie antygeny do komórek prezentujących antygen, będą też wzmacniały działanie sygnału pierwszego w aktywacji limfocytów T przez komórki dendrytyczne. Induktorami sygnału drugiego będą z kolei związki, które stymulują receptory rozpoznające wzorce patogenów. Przykładowo są to lipoproteiny stymulujące receptory TLR2, LPS i MPL (monofosforylowany lipid A), które są rozpoznawane przez receptor TLR4, czy flagellina działająca poprzez receptor TLR5 [75]. Do grupy adiuwantów wzmacniających sygnał trzeci należą związki immunomodulujące, takie jak alum, chitosan oraz biodegradowalne mikro- i nanocząstki [76]. Dotychczas nie opisano adiuwantu, który by efektywnie wspomagał sygnał czwarty.



Rysunek 2 Sygnały aktywacji limfocytów T.

Część z powyżej wymienionych to adiuwanty dośluzówkowe. Obecnie badane i stosowane adiuwanty dośluzówkowe zostały zebrane w **Tabeli 2**. Toksyna *E. coli* oraz toksyna cholery są adiuwantami dośluzówkowymi o najsilniejszym działaniu, ale są zbyt toksyczne, żeby je zastosować u ludzi. Z uwagi na powyższe, zaprojektowano zmutowane toksyny ze zmniejszoną aktywnością enzymatyczną. LTR63 i LTR72 to inaktywowane toksyny *E. coli*. Ich połączenie z odpowiednimi antygenami dało ochronę w eksperymencie typu „challenge” przeciwko wirusowi opryszczki pospolitej [77], *Bordatella pertussis* [78] i *Streptococcus pneumoniae* [79]. Mutanty toksyny *E. coli* zostały również użyte w formie adiuwantu w połączeniu z antygenem szczepionkowym HIV-1 p55 gag, formulację podano doustnie i donosowo myszom [80]. W powyższych przykładach, właściwości ochronne wynikały z silnej indukcji cytotoksycznych limfocytów T. Prawdopodobny mechanizm działania polega na zwiększaniu przepuszczalności nabłonka, ułatwionym poborze antygeny przez komórki układu

immunologicznego i ich ulepszonej prezentacji [81]. Podanie doustne zmutowanych toksyn ułatwia dotarcie antygenów do komórek M [82].

Jedną z większych grup adiuwantów dośluzówkowych są agoniści receptorów TLR [83]. Są one oparte o wzorce molekularne patogenów i często łączone z emulsjami. Przykładowo, adiuwant IC31 i inne formułacje zawierające CpG, które działają na receptor TLR9 okazały się efektywne na modelu zwierzęcym i w badaniach klinicznych [84]. MPL, działający na receptor TLR4 i flagellina, która jest ligandem receptora TLR5 wykazywały pośrednią efektywność [85]. Liposomy dodatnio naładowane i pochodna saponiny QS21 są efektywne w immunizacji śluzówkowej, ale mechanizm ich działania jest bardzo słabo poznany [86,87].

Stworzenie uniwersalnego adiuwantu jest niezwykle trudne ze względu na dużą zmienność genetyczną i epigenetyczną u ludzi. Co oznacza, że adiuwant, który u większości osób nie wywołuje żadnych skutków ubocznych, może być szkodliwy u pojedynczych pacjentów [88]. Może to wynikać z tego, że ludzie różnią się między sobą genetycznie i epigenetycznie. Co więcej, działanie adiuwantu może być ograniczone jedynie do określonych antygenów [89]. Kolejną niedoskonałością obecnie stosowanych adiuwantów jest to, że ich zastosowanie w szczepionkach podawanych parenteralnie, w większości wypadków, nie indukuje odpowiedzi immunologicznej w śluzówce, ale wyłącznie odpowiedź systemową [82].

Tabela 2 Charakterystyka adiuwantów śluzówkowych.

Adiuwant	Droga podania	Mechanizm działania	Rodzaj indukowanych przeciwciał*	Polaryzacja limfocytów	Produkcja cytokin i chemokin	Ref.
Inaktywowana enterotoksyna	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	wpływ na prezentację antygeny	IgG1, IgG2, IgA	Th1/Th2, CD8 ⁺	IL-6, IL-8, IL-10, IL1-(α , β)	[90,91]
Toksyna cholery	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	wpływ na prezentację antygeny	IgA, IgG1, IgE	Th2, CD8 ⁺	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10	[90,91]
MPL	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	TLR4	IgG2 w surowicy, IgA	Th1/Th17	IL-1, IL-17, IFN- γ	[92]
CpG	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	TLR9	IgG2a, IgA	Th1/Th2, CD8 ⁺	IL-6, IL-12, IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , IFN- γ	[90,93]
Protollina (LPS)	Donosowa	TLR2, TLR4	IgA, IgG w surowicy	Th1/Th2	IFN- γ , MIP-3 α , IL-18	[94,95]
Flagellina	Donosowa	TLR5, NLRC4	IgA, IgG	Th1/Th2	TNF- α , IFN- γ , MIP-2, IL-6	[92,96]
QS-21	doustna, donosowa	mechanizm nieznan	IgG2a, IgG2b, IgG1, IgE	Th1, CD8 ⁺	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10	[86,92,97]
Chitosan	doustna, donosowa	oddziaływanie elektrostatyczne	IgG, IgA w surowicy	odpowiedź limfocytów zależna od antygeny	IL-1 β , IL-18	[93]
PLGA	doustna, donosowa,	mechanizm nieznan	klasa przeciwciała zależna od antygeny	odpowiedź limfocytów	zależne od immunostymulatora	[98]

	dopochwowa			zależna od antygeny		
Emulsja	doustna, donosowa	mechanizm nieznan	klasa przeciwciała zależna od antygeny	Th1/Th2	zależne od immunostymulatora	[99]
Liposomy	doustna, donosowa	mechanizm zależny od miejsca aplikacji	IgA, IgG	odpowiedź limfocytów zależna od antygeny	IL-2	[100]
ISCOM	doustna, donosowa, dopochwowa	kierowanie i prezentacja	IgG1, IgG2a	Th1/Th2, CD8 ⁺	nie określono	[92]
Cząsteczki podobne do wirusa	doustna, donosowa, dopochwowa	wiele mechanizmów	IgA, IgG w surowicy	Th1/Th2	nie określono	[92,93]

*O ile nie zaznaczono inaczej, kolumna pt. „rodzaj produkowanych przeciwciał” określa przeciwciała oznaczane na słuzówce. Skróty wyjaśniono w wykazie skrótów.

4.2.2. Pozostałe składniki szczepionek

Oprócz antygeny i adiuwanty w skład szczepionki wchodzi: konserwanty, stabilizatory oraz śladowe ilości związków pozostałych po procesie produkcji, takie jak: antybiotyki, formaldehyd, białka drożdży i jaja kurzego. Składniki te pojawiają się zarówno w szczepionkach parenteralnych jak i dośluzówkowych.

To, co odróżnia pod kątem składu, szczepionki dośluzówkowe od parenteralnych, to obecność dodatkowych składników, jak na przykład nośniki polimerowe. Dodatki te mają wydłużać czas przebywania antygeny, przykładowo w jamie nosowej i dzięki temu zwiększać jego szanse na dotarcie do komórek immunokompetentnych. Działanie większości z nich polega na wykazywaniu mukoadhezji (bioadhezji). Przykładami takich dodatków pochodzenia biologicznego są mikrokapsuły zbudowane z alginianu, żelatyny czy skrobi. Bada się również w tym zakresie, biodegradowalne polimery pochodzenia chemicznego, takie jak: polimetakrylan, karbopol, polikaprolakton, czy polimetakrylan metylu [101]. Przykłady powyższych polimerów zostaną opisane w kolejnym rozdziale.

4.3. Szczepionki donosowe

Podanie donosowe szczepionki, jak już wcześniej wspomniano, jest atrakcyjną alternatywą dla tradycyjnego podania parenteralnego, ponieważ jest mniej inwazyjne i co najważniejsze, umożliwia wzbudzenie zarówno silnej odpowiedzi systemowej, jak i lokalnej na powierzchni śluzówki. Rozwój tych szczepionek jest jednak utrudniony przez problemy związane z dostarczeniem antygenów szczepionkowych, gdyż są one szybko usuwane z jamy nosowej i słabo absorbowane przez komórki nabłonka. Powyższe trudności sprawiają, że antygeny podawane donosowo zwykle wykazują słabe działanie immunogenne.

Jama nosowa jest dogodnym miejscem depozycji antygeny ze względu na to, że jest łatwo dostępna, a wyściełająca ją śluzówka cienka, dobrze ukrwiona i bogata w komórki dendrytyczne, które to komórki poprzez kontakt z patogenami (lub antygenem szczepionkowym) indukują przeciwko nim silną odpowiedź immunologiczną [102]. Komórki nabłonka posiadają mikrokosmki, które znacznie powiększają powierzchnię chłonną nabłonka jamy nosowej. Dodatkowo, aktywność enzymatyczna w jamie nosowej jest stosunkowo słaba, w wyniku czego, antygen nie ulega tak szybkiej degradacji, jak na przykład w jamie ustnej i żołądka przy podaniu doustnym. Dodatkowo, wprowadzane

substancje trafiają bezpośrednio do układu krążenia. Jama nosowa jest pierwszym miejscem kontaktu z patogenami, takimi jak wirusy grypy czy inne mikroorganizmy powodujące choroby górnych dróg oddechowych, patogeny powodujące zapalenie opon mózgowych, odrę czy krztusiec. Obecność neutralizujących przeciwciał i odporność komórkowa w miejscu ataku tych patogenów pozwoli zapobiec rozwojowi powodowanych przez nie chorób. Co ciekawe, funkcjonowanie układu immunologicznego śluzówki nosa nie pogarsza się z wiekiem, jak w przypadku systemowego układu immunologicznego, przez co możliwa jest immunizacja osób również w podeszłym wieku [103]. Małe, rozpuszczalne antygeny mogą przechodzić bezpośrednio przez nabłonek i oddziaływać z komórkami układu immunologicznego znajdującymi się w głębszych warstwach śluzówki. Następnie, te antygeny, są przekazywane do powierzchniowych szyjnych węzłów chłonnych, a stamtąd do tylnych węzłów chłonnych [104]. Natomiast, antygen w postaci cząsteczkowej, jest pobierany przez komórki M oraz przekazywany do szyjnych węzłów chłonnych. Tak pobrany antygen może wzbudzić odpowiedź zarówno lokalnie jak i w odległych rejonach śluzówki [6].

Pomimo dużej przepuszczalności nabłonka, pewne związki z trudem przedostają się do głębszych warstw śluzówki. Oddziaływanie między antygenem a śluzówką zależy od wielu czynników, a w szczególności od fizycznych właściwości antygeny, jego dawki i długości kontaktu [6]. Duże i hydrofilowe cząsteczki, jak na przykład białka, są bardzo słabo transportowane przez śluzówkę. Dodatkowo, ciągły ruch rzęsek obecnych na komórkach nabłonka, szybko usuwa podawane substancje zawieszane w gęstym śluzie, utrudniając ich kontakt z głębszymi warstwami śluzówki. Co więcej, podanie zbyt dużej dawki szczepionki, może negatywnie wpływać na funkcjonowanie tego organu.

Antygen szczepionkowy, jak wspomniano powyżej, musi pokonać szereg barier, aby ostatecznie dotrzeć do komórek tworzących NALT. Przede wszystkim warstwę śluzu, która nieustannie usuwa antygen z jamy nosowej uniemożliwiając bezpośredni kontakt z komórkami dendrytycznymi. Śluz to mieszanina złożona w 95% z wody, 2% mucyny, 1% soli, 1% innych białek, takich jak albumina, immunoglobuliny, lizozym, laktoferyna i <1% lipidów [105]. Każdego dnia, w jamie nosowej produkowane jest od 1,5 do 2 litrów śluzu. Powłoka śluzu pokrywająca nabłonek ma około 5 μm grubości i składa się z dwóch warstw, dolnej warstwy zolu i górnej żelu o różnych właściwościach reologicznych. Śluz obecny na powierzchni nabłonka ochrania go, utrzymuje odpowiednią wilgotność w jamie nosowej, zapobiega utracie ciepła, wyłapuje cząstki, które dostały się do wnętrza

nosa i transportuje je w stronę układu pokarmowego. Antygeny podjednostkowe, które nie wykazują powinowactwa do komórek nabłonka, są usuwane z jamy nosowej z prędkością 6 mm/min [106]. Proces ten może zostać przyspieszony w przypadku schorzeń, takich jak astma, katar, alergia czy choroby zatok i może mieć wpływ na czas pobytu szczepionki w jamie nosowej. Do poprawnego działania powyższego mechanizmu ochronnego potrzebne są jony wapnia, ponieważ brak jonów wapnia w środowisku powoduje zahamowanie ruchu rzęsek [107]. Zastosowanie nośników leków, które chelatują jony wapnia, na przykład kwasu poliakrylowego, wydłuża czas pobytu leku w nosie i zwiększa przepuszczalność nabłonka [108].

Celem zapobiegania szybkiemu usuwaniu leku/antygeny z jamy nosowej, stosuje się dodatki w postaci związków wykazujących mukoadhezję, czyli mających powinowactwo do mucyny, białka występującego w dużej ilości w śluzie oraz na powierzchni komórek nabłonkowych jamy nosowej. Jeśli ten sam związek oddziałuje również z antygenem, wtedy możliwe jest opóźnienie usunięcia antygeny z jamy nosowej [109]. Mucyna występuje w śluzie w dwóch formach: wolnej i związanej z powierzchnią nabłonka [110,111]. Związki wykazujące mukoadhezję można podzielić na trzy grupy w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Pierwszą grupę tworzą polimery hydrofilowe, które oddziałują ze śluzówką poprzez tworzenie wiązań wodorowych i do tej grupy należą: alginian sodu, karboksymetyloceluloza, hydroksypropyloceluloza oraz karbopol. Do drugiej grupy należą polimery naładowane dodatnio, jak na przykład pochodne chitosanu zawierające dodatnio naładowane grupy chemiczne czy emulsje zawierające detergenty kationowe. Do trzeciej grupy należą związki zawierające wolne grupy tiolowe zdolne do tworzenia mostków disiarczkowych z cysteiną obecną w sekwencji aminokwasowej mucyny [112,113].

Kolejnym rozwiązaniem, mającym na celu ułatwienie dostarczenia antygeny do układu immunologicznego śluzówki, jest stosowanie związków ułatwiających pobór antygeny przez komórki M. Jest to szczególnie istotne w przypadku zabitych patogenów oraz dużych cząsteczek, których przenoszenie przez warstwę nabłonka, na przykład poprzez poluzowane połączenia międzykomórkowe, jest utrudnione [114]. Błona komórkowa komórek M jest ujemnie naładowana, a zatem związki o dodatnim ładunku powinny być lepiej pochłaniane. Nie jest to jednak oddziaływanie specyficzne. Do specyficznych ligandów celujących w komórki M należą lektyny, które rozpoznają galaktozo- α -(1-3)-galaktozę i kwasy sialowe [115] oraz integryny. Wiele patogenów jak na przykład *Yersinia pestis* czy niektóre szczepy *E. coli* wykorzystują β_1 -integryny celem

przedostania się do wnętrza organizmu [116]. Gullberg i inni wykazali, że zastosowanie lateksowych kulek pokrytych ligandem β_1 -integryny znacznie zwiększało ich pobór przez ludzkie komórki M w eksperymencie przeprowadzonym *in vitro* [117].

Nośniki oparte o lipidy, np. ISCOMS, ułatwiają dostarczenie antygeny do komórek dendrytycznych dzięki wpływaniu na właściwości błony komórkowej [118], oraz indukują odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych. Podobnie jak i wirosomy (błona komórkowa wirusa bez jego zawartości, ale z białkami błonowymi), które aktywują odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych, odpowiedź humoralną i komórek Th [119].

Jednym z przykładów takich nośników dostosowanych do podania donosowego, a pełniących jednocześnie funkcję adiuwantów są nanoemulsje. Nanoemulsje są oparte o emulsję typu olej w wodzie (O/W), składają się z oleju sojowego, CPC, Tween80[®], etanolu i wody. Powstają w wyniku użycia emulsyfikatora o dużej mocy, a wielkość kropelek nanoemulsji jest mniejsza niż 1 μm . Nanoemulsje promują pobór antygeny w testach *in vitro* i *in vivo* [120], podawane donosowo wzbudzają odpowiedź typu Th1 i Th17 [121], w połączeniu z antygenem wirusa zapalenia wątroby typu B indukują miano przeciwciał porównywalne do alum [122]. Nanoemulsje są prekursorami nanoadiuwantów, które zostaną scharakteryzowane w dalszej części rozprawy.

4.4. Badania nad szczepionką przeciwko *Clostridium difficile*

Clostridium difficile (CD), nazywana również *Clostridioides difficile* [123], jest beztlenową Gram-dodatnią bakterią oportunistyczną i stanowi składnik mikroflory jelitowej u około 3% populacji. Bezobjawowe nosicielstwo bywa dużo częstsze u osób hospitalizowanych i u personelu medycznego, u którego częstość występowania CD wynosi 10-30% [124]. Bakteria staje się groźna dla organizmu w momencie powstania dysbiozy, czyli zaburzenia składu ilościowego i jakościowego bakteryjnej mikroflory jelitowej [125]. Dysbioza prowadząca do rozwoju CDI (choroba związana z CD, z ang. *Clostridioides difficile infection*) jest zwykle wywoływana na skutek kuracji antybiotykowej klindamycyną, cefalosporynami, penicyliną lub fluorochinolonami [126]. CD, dzięki oporności na wymienione antybiotyki, masowo namnaża się w jelitach, po czym rozpoczyna produkcję toksyn (TcdA, TcdB) odpowiedzialnych za objawy choroby. Mechanizm działania toksyn polega na uszkodzeniu cytoszkieletu komórki oraz połączeń międzykomórkowych, przez co dochodzi do zniszczenia nabłonka jelita

i gromadzenia się płynów, co skutkuje biegunką [127]. Dodatkowo, bakteria produkuje ogromne ilości spor będących w stanie przetrwać przez długi czas na powierzchniach szpitalnych, takich jak oparcia łóżka i blaty. Spory są rozsiewane przez pacjenta, przez co mogą prowadzić do kolejnych zakażeń osób będących w jego otoczeniu. Objawy CDI mają szerokie spektrum, od biegunki o łagodnym przebiegu i bólu brzucha poprzez rzekomobłoniaste zapalenie jelit, a w najcięższym przypadku może prowadzić do rozdęcia okrężnicy, perforacji jelita, a nawet zgonu.

CDI dotyczy w głównej mierze hospitalizowanych pacjentów w podeszłym wieku i po licznych kuracjach antybiotykowych [128]. Jednak z obserwacji klinicystów wynika, że grupa ryzyka stale powiększa się, a choroba coraz częściej dotyka również pacjentów poniżej 60 roku życia i bez historii hospitalizacji. Jediną dostępną formą walki z patogenem jest kuracja antybiotykowa, jednakże bakteria wykazuje coraz większą oporność względem stosowanych leków [129,130]. Klinicyści alarmują o nowych ogniskach chorobowych oraz o braku efektywnych, innych niż antybiotyki, metodach walki z patogenem i przeciwdziałaniu tym zakażeniom.

4.4.1. Charakterystyka zakażeń *Clostridium difficile*

Pierwsze objawy choroby mogą pojawić się już po około tygodniu od rozpoczęcia kuracji antybiotykowej, ale nie jest to regułą. Według polskich rekomendacji Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków z 2018 roku leczenie powinno się rozpocząć od zaprzestania stosowania antybiotyków, które doprowadziły do powstania CDI, a następnie należy zastosować doustnie wankomycynę lub fidaksozomycynę przez 10 dni. Metronidazol podaje się, jako lek pierwszego rzutu, ale tylko w przypadku łagodnych zakażeń [131]. W przypadku osób z mnogimi nawrotami, u których terapia antybiotykowa zakończyła się niepowodzeniem, można zastosować transfer mikrobioty jelitowej od osoby zdrowej. Skuteczność tego leczenia oceniana jest na 77-100% w zależności od zastosowanej procedury [132,133]. Metoda ta jednak wiąże się z wieloma problemami, ponieważ jej standaryzacja jest niemożliwa, a sama metoda czasem, z wielu powodów (np. psychologicznych), jest trudna do przyjęcia przez pacjenta. Inne metody leczenia to zastosowanie przeciwciał mono- i poliklonalnych, jednak te metody są nadal w fazie badań klinicznych. Zapobieganie chorobie polega na przestrzeganiu reżimów higienicznych, izolacji zakażonych pacjentów oraz ograniczeniu użycia antybiotyków wysokiego ryzyka. Nie są to jednak działania wystarczające, na co

wskazuje pogarszająca się statystyka zachorowań.

Zapadalność na CDI wzrasta każdego roku. W Europie notuje się 30 przypadków zachorowań na CDI na 100 000 osób, a z tego 8 382 przypadków kończy się śmiertelnie [134]. Notuje się również coraz więcej przypadków zachorowań osób bez występujących czynników ryzyka, takich jak zażywanie antybiotyków czy niedawna hospitalizacja [135,136]. Z raportów przygotowywanych przez Europejskie Centrum do Spraw Kontroli i Prewencji Chorób wynika, że w latach 2011-2013 średnia zapadalność na CDI w szpitalach wynosiła 7/10 000 osobodni [137], a dla Polski to 8,4/10 000 osobodni. Autorzy raportu sugerują jednak, że te dane są niedoszacowane, a właściwa zapadalność wynosi odpowiednio 18,01/10 000 oraz 38,85/10 000 osobodni dla Europy i Polski. Dane Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego również pokazują wzrost liczby przypadków CDI. W roku 2016 było to 8716 (22,7/100 000 mieszkańców) przypadków, a w 2017 już 11667 (30,4/100 000) [138]. Niestety, Polska przoduje również w częstoci występowania hiperwirulentnego szczepu 027, u którego stwierdzono obecność trzech toksyn i zwiększoną oporność na antybiotyki. Wyniki badań przeprowadzonych w 13 polskich szpitalach w latach 2011-2013 pokazują, że 62% przypadków CDI było wywołanych przez szczep 027, a 14% z nich przez blisko spokrewniony szczep 176 [139]. Najnowsze dane z 2017 roku, zebrane na terenie województwa śląskiego, mówią nawet o 80% przypadków wywołanych przez hiperwirulentny szczep 027 [140].

Wraz ze zwiększającą się zapadalnością na CDI wzrastają ogólne koszty leczenia, które wynikają z przedłużonego pobytu pacjenta w szpitalu (zwykle dodatkowe 15 dni), czyli dodatkowej opieki, diagnostyki i leczenia [141]. W przypadku nawrotów zakażenia, koszty są jeszcze wyższe, ponieważ wymagają zastosowania bardziej efektywnych i droższych leków. W USA wyliczono, że same koszty poniesione przez służbę zdrowia na leczenie tych pacjentów wynoszą około 4,8 mld dolarów rocznie [142]. W przypadku Europy, wyliczenia wskazują na koszt całkowity rzędu nawet 3 miliardów euro [143].

CD jest bakterią trudną do zwalczania z kilku względów. Lista czynników wirulencji tej bakterii jest długa: wspomniane toksyny TcdA i TcdB oraz toksynę binarną CDT, produkcja odpornych spor, wzrost w postaci biofilmu, wić (flagellum), białka warstwy S, białko Cwp66 i GroEL, proteaza Cwp84 i białko wiążące fibronektynę (Fbp68) [144]. Po drugie, CD nieprzerwanie poszerza spektrum swojej oporności na antybiotyki, również o te stosowane do jej zwalczania. Opisano pierwsze szczepy odporne na metronidazol i wankomycynę [145], a oporność na rifampicynę sięga już 15% przebadanych szczepów [130,146]. W przypadku metronidazolu, obserwuje się również

znaczny wzrost dawki potrzebnej do wyleczenia zakażenia, a w szczególności dla szczepu RT 027 [147]. Biorąc pod uwagę, że 11% genomu bakterii stanowią elementy, które mogą zmieniać swoją lokalizację, należy spodziewać się szybkiego wzrostu oporności na skutek nabywania nowych kaset oporności [148]. Po trzecie, pojawiają się szczepy hiperwirulentne, o zwiększonej produkcji spor, toksyn oraz poszerzonej oporności na antybiotyki, taki jak wspomniany wcześniej szczep RT 027. Te szczepy częściej prowadzą do cięższych powikłań, jak np. rozdęcie okrężnicy [149]. Po czwarte, choroba ma charakter nawracający u około 30% wyleczonych pacjentów [150].

Powyższe wyliczenia są alarmujące, sytuacja pogarsza się, a wynika to z tego, że działania prewencyjne są niewystarczające, ciągle wzrasta spożycie antybiotyków, a lista potencjalnych zagrożeń się wydłuża. Rezerwuarem CD są: gleba, bydło i świnie oraz mięso zakażonych zwierząt. Człowiek, jako osoba zarażona, też staje się źródłem zakażeń ludzi zdrowych. Nie opisano, jak dotąd, przypadku bezpośredniej transmisji bakterii ze zwierzęcia na człowieka, jednak wskazano na możliwość transmisji pośredniej poprzez mięso zakażonych zwierząt [151]. Co więcej, spory CD znajdują się nie tylko na powierzchniach szpitalnych, ale i w powietrzu, co może znacznie ułatwiać ich rozprzestrzenianie [152]. Tylko nieliczne kraje Europy zachodniej podjęły walkę z CD poprzez zaostrenie reżimów higienicznych oraz ostrożniejszą gospodarkę antybiotykami. Pierwsze efekty uzyskane w tych krajach są obiecujące, jednak nadal problem narasta w pozostałych krajach, a szczególnie w krajach, takich jak Chiny czy Rosja, gdzie antybiotyki są zdecydowanie nadużywane. W przypadku krajów azjatyckich czy afrykańskich brak jest jakichkolwiek rzetelnych danych. Z uwagi na powyższe uzasadnione są wszelkie prace nad nowymi metodami leczenia i prewencji CDI.

4.4.2. Odpowiedź wrodzonego układu odpornościowego na zakażenie

Organizm posiada trzy linie obrony względem CD. Pierwszą z nich jest nabłonek jelita, który po zakażeniu CD zostaje uszkodzony przez toksyny poprzez degradację połączeń komórkowych. Po tym, następuje dalsza odpowiedź wrodzonego układu odpornościowego ze strony komórek nabłonkowych, makrofagów, monocytów, komórek tucznych i komórek dendrytycznych, której efektem jest masowy napływ neutrofilów i silny stan zapalny. To prowadzi do uruchomienia trzeciej linii obrony, czyli adaptacyjnego układu immunologicznego, zwalczania zakażenia i wytworzenia pamięci

immunologicznej. Toksyny i białka powierzchniowe bakterii oddziałują zarówno z wrodzonym jak i adaptacyjnym układem odpornościowym.

Pierwszym zadaniem toksyn CD jest uszkodzenie nabłonka jelita po to, aby umożliwić dalszą inwazję bakterii. Mechanizm działania obu toksyn jest taki sam - obie nieodwracalnie inaktywują małe GTPazy z rodziny Ras poprzez ich glikozylację. Wyłączenie aktywności tych białek powoduje zatrzymanie łańcucha sygnałów w komórce i jej śmierć. Toksyny, aby tego dokonać, muszą najpierw dostać się do wnętrza komórki w procesie endocytozy, wykorzystując do tego odpowiednie receptory na powierzchni komórki gospodarza [153]. Wiązanie się toksyny i receptora jest pierwszym i niezbędnym krokiem wejścia do wnętrza komórki. Blokowanie tego procesu może być jednym ze sposobów walki z zakażeniem. Z badań wynika, że receptory, do których wiążą się toksyny nie są białkami, a cukrami. Przykładowo, receptorem dla TcdA jest dwucukier Gal β 1-4GlcNac [154] obecny w I, X i Y antygenach krwi w organizmie człowieka. Nie określono, jak dotąd, receptora dla toksyny B. Wiadomo jedynie, że jest powszechny, gdyż toksyna działa na wiele różnych typów komórek. Toksyny ulegają modyfikacji po wejściu do wnętrza komórki, jest to niezbędne do ich aktywności. Dzieje się to pod wpływem niskiego pH lizosomu [155]. Proces glikozylacji białek RhoA, Rac i CDc42 odbywa się poprzez przeniesienie reszty cukrowej na aminokwas Thr-37 GTPazy [156]. Wynikiem tej modyfikacji jest kondensacja aktywny, utrata kształtu komórki, apoptoza i w konsekwencji jej śmierć. Toksyna B wydaje się mieć większą aktywność enzymatyczną niż toksyna A [157]. Co więcej, obie toksyny niszczą ściśle połączenia między komórkami nabłonkowymi (z ang. *tight junctions*) [158]. Wpływa to nie tylko na integralność nabłonka ale i powoduje napływ neutrofilów, co jest typowym objawem rzekomobłoniastego zapalenia jelita i pierwszą odpowiedzią wrodzonego układu odpornościowego na zakażenie [159].

Toksyny TcdA i TcdB aktywują kaskadę sygnałową odpowiedzialną za produkcję cytokin prozapalnych w komórkach nabłonka jelita. TcdA włącza produkcję IL-8, jest to silny chemoatraktant dla neutrofilów [160], oraz indukuje produkcję TNF- α przez makrofagi i komórki tuczne [161]. Obie toksyny stymulują powstawanie reaktywnych form tlenu [162], które poprzez kilka różnych dróg, potęgują produkcję IL-8. Wszystko to prowadzi do chronicznego stanu zapalnego, głównie w jelicie grubym i do powstania charakterystycznych żółtawych „tarczek jelitowych” widocznych u pacjenta w badaniu endoskopowym. Powstałe tarczki utrudniają wchłanianie związków odżywczych w świetle jelita. Po przekroczeniu bariery komórek nabłonka, toksyny zaczynają

oddziaływać na komórki układu odpornościowego, w wyniku czego, pojawia się kolejna fala czynników prozapalnych przyciągających neutrofile. W przypadku ludzkich komórek tucznych, TcdB potęguje produkcję prostaglandyn, a te z kolei powodują wyrzut IL-8 [163]. Obie toksyny aktywują inflammasom, czyli wielobiałkowy kompleks, który w odpowiedzi na zagrożenie w postaci patogenu włącza kaspazę 1. Zadaniem kaspazy 1 jest zmiana prekursorów IL-1 β oraz IL-18 w ich aktywne formy. IL-1 β bierze udział w systemowej i lokalnej odpowiedzi na zakażenie w postaci wywołania gorączki, aktywacji limfocytów i indukcji napływu leukocytów w miejsce zakażenia. IL-18 indukuje produkcję IFN- γ oraz współuczestniczy w polaryzacji komórek w stronę odpowiedzi typu Th1, czyli reakcji zapalnej [164]. Toksyny oddziałują również na komórki dendrytyczne. Szczepy CD 630 oraz R20291 027 podane komórkom dendrytycznym *in vitro* zwiększały produkcję IL-12, IL-10 oraz IL-1 β przez te komórki. Hodowle komórek dendrytycznych zakażone oboma szczepami indukowały podobny poziom proliferacji komórek T oraz pośredniczyły w indukcji odpowiedzi typu Th1 oraz Th17. Poziomy badanych cytokin były różne dla badanych szczepów, co sugeruje, że rozwój choroby i rokowania zależą od rodzaju zakażającego szczepu [165].

CD moduluje wrodzony układ immunologiczny gospodarza również w sposób niezależny od toksyn. CD silnie stymuluje receptory NOD1, które są specyficzne względem peptydoglikanu. Zarówno szczepy toksynotwórcze jak i te, które nie wydzielają toksyn, są w stanie aktywować receptory NOD1, co prowadzi do produkcji CXCL1 i IL-6 przez mysie makrofagi badane *in vitro*. Obie te substancje działają silnie prozapalnie. W badaniach *in vivo*, myszy pozbawione receptorów NOD1 znacznie częściej nie przeżywały zakażenia CD w porównaniu do myszy dzikich. Co ciekawe, uszkodzenie nabłonka u badanych myszy było takie samo w obu grupach, jednak mutanty pozbawione receptora NOD1 wykazywały niższy poziom chemokiny CXCL1 i słabszy napływ neutrofilów do miejsca zakażenia. Te dane wskazują na to, że napływ neutrofilów jest czynnikiem bardzo ważnym w procesie zwalczania zakażenia [166].

Antygeny powierzchniowe CD oddziałują również z receptorami TLR, czyli białkami, które specyficznie rozpoznają struktury mikroorganizmów. Wykazano, że białka warstwy S (SLP) wiążą receptor TLR4 [167]. Białka SLP indukowały dojrzewanie komórek dendrytycznych, podobnie jak LPS, poprzez zwiększoną ekspresję białek prezentujących antygeny MHCII oraz receptorów CD40, CD80 i CD86. Takiego efektu nie stwierdzono w przypadku myszy pozbawionych receptora TLR4. Co ciekawe, oba białka budujące warstwę S - o dużej i małej masie cząsteczkowej (HMW i LMW), są

potrzebne do interakcji z receptorem TLR4. Białka warstwy S wzbudzają również słabą odpowiedź typu Th2 prowadzącą do produkcji przeciwciał. U myszy pozbawionych receptora TLR4 nie stwierdzono odpowiedzi w postaci specyficznych przeciwciał IgG.

W przypadku flagelli, jej monomery rozpoznawane są przez receptor TLR5, czego efektem jest produkcja IL-8 oraz CCL20 przez komórki układu odpornościowego. Nie poznano, jak dotąd, w jaki sposób organizm odróżnia flagellinę szczepów patogennych od niepatogennych. W jelicie, receptory TLR5 znajdują się głównie po bazolateralnej stronie komórek nabłonkowych, co wymusza dostarczenie im flagelliny ze światła jelita. W przypadku CDI toksyny niszczą warstwę nabłonka, przez co flagellina łatwo dociera do receptora TLR5. Badania *in vitro* pokazały, że potraktowanie komórek toksyną TcdB, a następnie podanie flagelliny znacznie zwiększa poziom produkowanych cytokin [168].

4.4.3. Odpowiedź adaptacyjnego układu odpornościowego na zakażenie

Obecnie na rynku nie ma szczepionki przeciwko CD. Niemniej jednak, znajomość przebiegu zakażenia i czynników wirulencji CD doprowadziła do zaprojektowania i wprowadzenia do badań klinicznych kilku rozwiązań mających zapobiegać zakażeniom. Bada się zarówno pasywną jak i aktywną immunizację.

Potencjalny antygen szczepionkowy musi być specyficzny dla CD, immunogeny i konserwatywny w obrębie szczepów klinicznych. Co więcej, cel powinien być nakierowany na łatwo dostępne antygeny zlokalizowane na powierzchni komórki bakteryjnej i wywoływać odpowiedź, która działałaby ochronnie przed CDI, najlepiej na jak najwcześniejszym etapie zakażenia.

4.4.3.1. Odpowiedź na toksyny CD

Pierwsze badania nad poantybiotycznym zapaleniem okrężnicy wykazały, że choroba może zostać wywołana w modelach *in vivo* treścią jelitową izolowaną od zwierząt, którym podano klindamycynę i które wykazywały objawy chorobowe [169]. Badania wykazały, że nie tylko bakteria, ale również samo medium hodowlane może powodować chorobę, przez co postulowano obecność toksyn. Dalsze badania wykazały, że toksyny są jednym z głównych czynników wirulencji tej bakterii. TcdA (308 kDa) i TcdB (270 kDa) są glukozylotransferazami, które inaktywują białka Rho, Rac i Cdc42 w komórkach, z którymi mają kontakt. Są jednymi z największych, pod względem masy cząsteczkowej, opisanych toksyn bakteryjnych. Składają się z N-końcowej domeny

enzymatycznej, C-końcowej domeny wiążącej receptor i środkowej domeny służącej do translokacji przez błonę komórkową. Geny obu toksyn zakodowane są na chromosomie w obrębie regionu *locus* patogenności i ulegają ekspresji podczas późnej fazy logarytmicznego wzrostu i fazy stacjonarnej. W szczepach klinicznych CD oznaczono wiele odmian genetycznych toksyn A i B. Taka zmienność wynika zarówno z wymiany genów pomiędzy toksynotwórczymi przedstawicielami rodzaju *Clostridium*, co skutkuje powstaniem hybryd genowych, jak i spontanicznymi delecjami i duplikacjami w obrębie tych genów. Każda sekwencja toksyn została przyporządkowana do jednego z 22 typów [170].

Wykazano bezpośredni związek poziomu produkowanych toksyn z rozwojem rzekomobłoniastego zapalenia jelita i czasem trwania biegunki [171]. Szczepy nieprodukujące toksyn, nie wywołują choroby. Jak dotąd, rola toksyny A została lepiej poznana niż toksyny B w przebiegu zakażenia. Wszystkie typowe objawy choroby, takie jak gromadzenie się płynu, zapalenie, uszkodzenie komórek mogą zostać wywołane w modelu zwierzęcym z użyciem jedynie toksyny TcdA. Co więcej, wysoki poziom przeciwciał IgG przeciwko toksynie TcdA hamuje rozwój choroby [172]. Zostało to również udowodnione doświadczalnie z użyciem przeciwciał monoklonalnych u myszy pozbawionych mikroflory jelitowej [173].

Obie toksyny nie zawsze występują jednocześnie, opisano zarówno szczepy TcdA⁻ TcdB⁺, jak i znacznie częściej występujące TcdA⁺ TcdB⁻ [174]. Co ciekawe, szczepy TcdA⁻ TcdB⁺ wykazują nawet większą zjadliwość niż szczepy produkujące toksynę TcdA, co jest pewnego rodzaju sprzecznością, ponieważ wczesne badania wykazały, że toksyna B nie jest w stanie samodzielnie wywołać choroby i potrzebuje do tego obecności toksyny TcdA [175]. Opisano jednak naturalnie występujące szczepy TcdA⁻ TcdB⁺, które są zdolne do wywołania choroby, nawet ze skutkiem śmiertelnym [176–178]. Prawdopodobnie toksyna TcdB może zastępować toksynę TcdA w przypadku jej braku lub też do jej aktywności są niezbędne inne związki produkowane przez CD nieobecne w badanych próbkach albo też, co bardziej prawdopodobne, u zwierząt modelowych brak jest odpowiednich receptorów.

Poza toksynami TcdA i TcdB, niektóre szczepy wytwarzają również toksynę binarną (CDT, 43 kDa), o aktywności ADP-rybozylotransferazy [179], która modyfikuje aktywną i ostatecznie również prowadzi do śmierci komórki. Jednym z takich szczepów jest hiperwirulentny szczep BI/NAP1/027. Sama toksyna binarna w niektórych modelach zwierzęcych jest niewystarczająca do wywołania objawów chorobowych i wtedy jedynie

wzmacnia działanie toksyn TcdA i TcdB [180], jednakże szczepy TcdA⁻ TcdB⁻ CDT⁺ są zdolne wywołać biegunkę u ludzi [181]. Choroba znacznie częściej kończy się śmiercią u pacjentów zakażonych szczepem produkującym wszystkie trzy toksyny [182].

Toksyny, pomimo dużego podobieństwa budowy i funkcji, inaczej stymulują adaptacyjny układ odpornościowy. Przeciwciała anty-TcdA neutralizują toksynę A, ale nie działają tak samo na toksynę TcdB. Podobnie w przypadku przeciwciał anty-TcdB – nie są w stanie neutralizować toksyny TcdA [183]. Wiele dzieci i dorosłych posiada przeciwciała IgG i IgA skierowane przeciwko toksynom CD. Przeciwciała anty-TcdA zostały opisane u 64% u pacjentów powyżej 2 roku życia, a anty-TcdB u 66% pacjentów starszych niż 6 miesięcy [184]. Specyficzne przeciwciała były już obecne w okresie noworodkowym, a ich poziom zwiększał się w czasie. Poziom specyficznych przeciwciał, nakierowanych na toksyny, ma przynajmniej częściowy wpływ na rozwinięcie się objawów chorobowych [185]. Pomimo, że 15-31% pacjentów z grupy wysokiego ryzyka było bezobjawowymi nosicielami CD, jedynie niektórzy przeszli pełnoobjawowe zakażenie. Bezobjawowi nosiciele mieli statystycznie istotnie wyższy poziom przeciwciał IgG anty-TcdA w trzecim dniu zakażenia niż pacjenci, którzy mieli biegunkę. Co więcej, pacjenci po pojedynczym zachorowaniu mieli wyższy poziom przeciwciał IgM przeciwko TcdA i TcdB niż pacjenci, którzy w późniejszym okresie cierpieli na nawrót choroby.

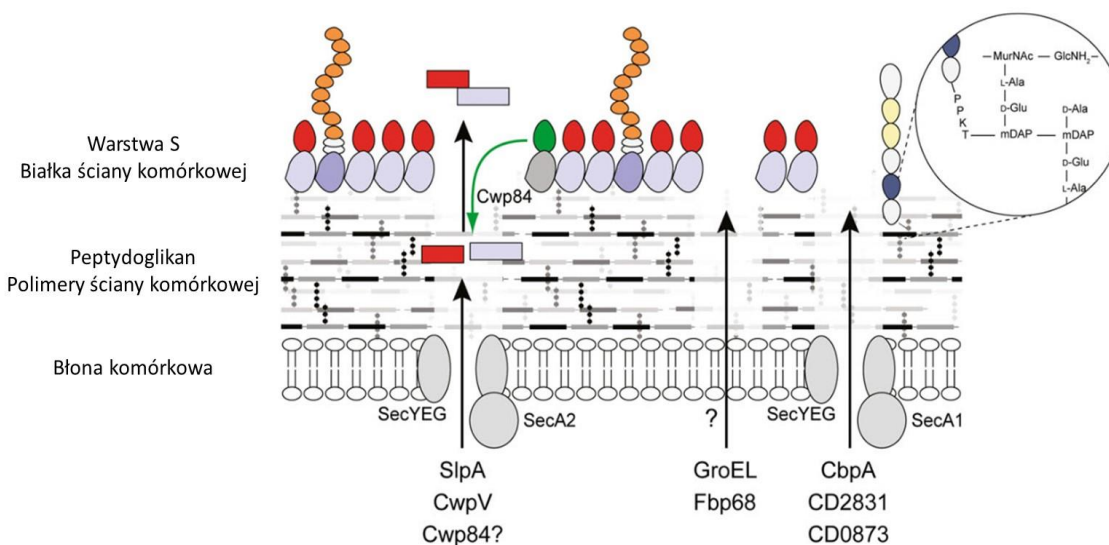
Trwają badania kliniczne dotyczące trzech szczepionek opartych o toksoidy CD. Najbardziej zaawansowane prace trwają nad szczepionką zawierającą wysokooczyszczone toksyny TcdA i TcdB inaktywowane formaliną podawane wraz z alum jako adiuwantem (Sanofi-Pasteur, CDIFFENSE™). Zakończono pierwszą (NCT00127803), drugą (NCT00772343 i NCT01230957), oraz trzecią fazę (NCT02052726) badań klinicznych. Opublikowane zostały jedynie częściowe dane [186,187]. Dowiedziono, jak dotąd, że szczepionka jest immunogenna i bezpieczna. Kolejna szczepionka w fazie badań klinicznych to oparta o genetycznie zmodyfikowane toksoidy TcdA i TcdB (Pfizer, USA, NCT02052726, NCT02117570, NCT 02561195). Trzecia ze szczepionek w trakcie badań klinicznych to VLA84 (Valneva, Austria, NCT01296386, NCT02316470), składająca się z białka złożonego ze skróconych sekwencji aminokwasowych TcdA i TcdB.

Uważa się jednak, że szczepionka zawierająca jedynie toksoidy nie zapobiegnie przenoszeniu się bakterii pomiędzy pacjentami oraz nie zlikwiduje zakażenia na jego wczesnym etapie [188]. W potencjalnych szczepionkach powinny się znajdować również

inne antygeny, na przykład białek powierzchniowych, immunizacja którymi zapewniłaby odpowiedź na wcześniejszym etapie zakażenia, nie doprowadzając do masowej kolonizacji i produkcji toksyn niszczących jelito pacjenta.

4.4.3.2. Odpowiedź adaptacyjna na antygeny powierzchniowe CD

Powierzchnia komórki CD jest typowa dla Gram dodatnich bakterii, którą tworzą gruba ściana komórkowa zbudowana z peptydoglikanu i położona za nią błona komórkowa. Na powierzchni peptydoglikanu CD znajduje się dodatkowa powłoka złożona z białek, które tworzą tzw. warstwę S (z ang. *S-layer*) (**Rysunek 3**). Warstwa S, jako najbardziej zewnętrzna i eksponowana do środowiska, jest obiektem wielu badań, ale nie znamy jeszcze wszystkich procesów i białek uczestniczących w jej tworzeniu. Powierzchnia ta zbudowana jest z białka z rodziny CWP (z ang. *Cell Wall Proteins*). Pod warstwą S, znajduje się kolejna warstwa, zbudowana z peptydoglikanu i kilku polimerów ściany komórkowej o budowie typowej dla CD. Podstawę tworzy błona komórkowa.



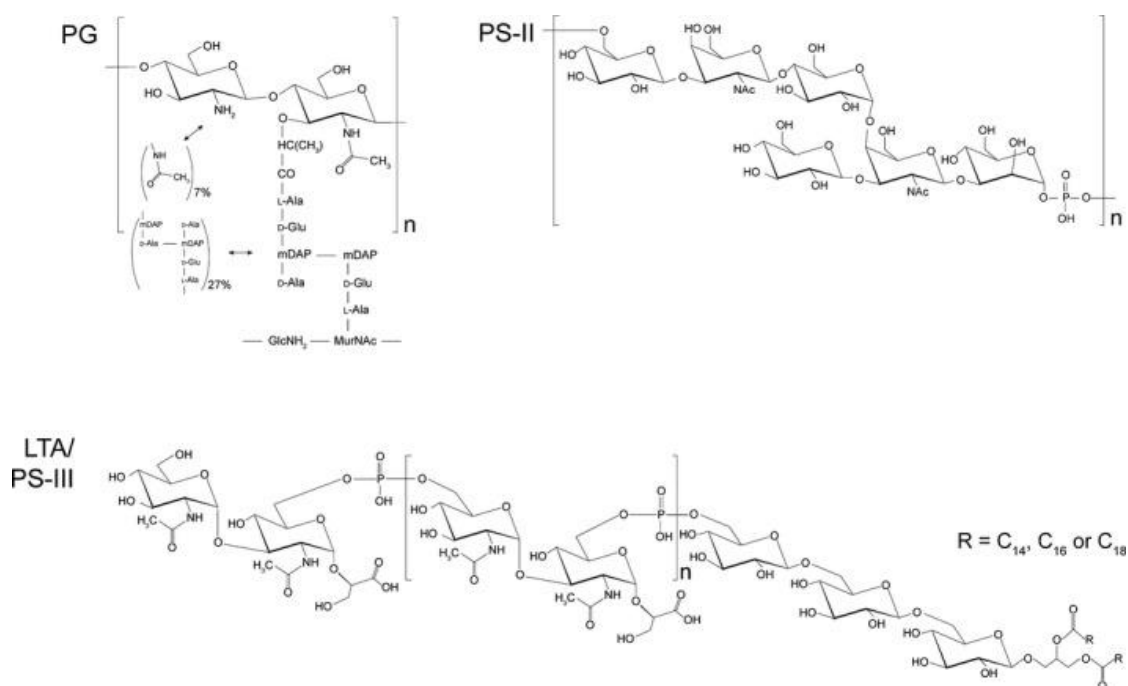
Rysunek 3 Organizacja powierzchni CD. Zaadaptowano z Kirk i inni [189].

Antygeny powierzchniowe mogą mieć potencjalne zastosowanie w szczepionkach. Przeciwciała nakierowane na elementy powierzchniowe CD zostały oznaczone u bezobjawowych nosicieli oraz u ozdrowieńców. U bezobjawowych nosicieli, ich poziom w surowicy krwi był wyższy niż u pacjentów z objawami choroby [190], co sugeruje, że mogą mieć właściwości ochronne.

4.4.3.2.1. Peptydoglikan i polimery ściany komórkowej

Peptydoglikan (PG) jest niezbędnym składnikiem ściany komórkowej CD i pełni szereg funkcji, takich jak utrzymanie kształtu komórki, czy wiązanie białek z rodziny CWP. Struktura PG jest konserwatywna pod względem budowy i składa się z długich łańcuchów polisacharydowych oraz sieciujących je mostków peptydowych. Część cukrowa zbudowana jest z dwucukru N-acetylo-D-glukozaminy i kwasu N-acetylo-D-muraminowego (GlcNAc-MurNAc) połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Mostek aminokwasowy u CD składa się z L-Ala-D-Glu-A₂pm-D-Ala (A₂pm: kwas 2,6-diaminopimelinowy) [191] (**Rysunek 4**). Oprócz typowego dla CD tetrapeptydu, peptydoglikan tej bakterii ma jeszcze dwie charakterystyczne cechy: wysoki poziom deacetylacji N-acetyloglukozaminy (do 93%) oraz nadzwyczaj częste sieciowanie typu 3-3 (73%) zamiast zwykle występującego typu 4-3.

Oprócz peptydoglikanu, na powierzchni CD opisano trzy ujemnie naładowane polimery: PS-I, PS-II i PS-III. PS-I, najrzadziej występujący, opisano po raz pierwszy u szczepu 027 [192]. Jest to polimer składający się z monomerów złożonych z pięciu cząsteczek fosforylowanych cukrów - ramnozy i glukozy. Dwa pozostałe polimery występują znacznie częściej i składają się z powtarzających się monomerów złożonych z sześciu cząsteczek cukrów – glukozy, mannozy i N-acetyloglukozaminy (PS-II) oraz związanego z lipidem fosforanu glikozyłu (PS-III), który jest zaliczany do rodziny kwasów lipotejchojowych (**Rysunek 4**) [192,193].



Rysunek 4 Polimery budujące ścianę komórkową CD. Zaadaptowano z Kirk i inni [189].

Nie dowiedziono jeszcze, jakie funkcje biologiczne pełnią te polimery. Postuluje się ich udział w wiązaniu białek ściany komórkowej oraz związków z transportem tych białek na powierzchnię komórki [194]. Ze względu na to, że struktury są łatwo dostępne na powierzchni komórki, bierze się je pod uwagę jako potencjalne antygeny szczepionkowe. Do badań potencjalnych szczepionek opartych o związki typu PS stosuje się syntezę chemiczną ze względu na dużą heterogenność oraz niski poziom ekspresji tych związków. Koniugat chemicznie zsyntezowanego PS-I z podjednostką toksyny TcdB badano jako potencjalny antygen szczepionkowy [195]. Przeciwciała skierowane na PS-II rozpoznają zarówno komórkę wegetatywną, jak i spory oraz działają ochronnie w mysim modelu zakażenia [196]. Oznaczono przeciwciała w surowicy pacjentów z CDI skierowane przeciwko chemicznie zsyntezowanemu PS-III [197]. Te badania pokazują potencjał polimerów powierzchniowych CD, jednak z ich zastosowaniem w szczepionkach wiąże się kilka problemów. Struktura PS-I różni się pomiędzy szczepami CD, a przeciwciała przeciwko PS-III rozpoznają również struktury pochodzące od innych przedstawicieli *Clostridium*. Najbardziej interesujące doniesienia dotyczą PS-II. Koniugat syntetycznego PS-II szczepu 027 oraz toksoidu tężcowego wzbudzał odpowiedź humoralną u szczepionych myszy oraz był rozpoznawany przez przeciwciała IgA pacjentów z CDI [198]. W koniugacie stosuje się również białka

pochodzenia CD. Koniugat PS-II oraz zrekombinowane fragmenty toksyn TcdA i TcdB indukowały produkcję specyficznych IgG zarówno względem części cukrowej jak i względem toksyn [199].

4.4.3.2.2. Białka warstwy S

Warstwa S to zbudowana z białek, para-krystaliczna powłoka okrywająca całą komórkę bakteryjną [200]. Warstwa S u CD składa się z około 590 000 podjednostek białkowych. Utrzymanie warstwy S, w fazie wzrostu, wymaga wyprodukowania i przetransportowania na zewnątrz 164 podjednostek białkowych na sekundę [189]. Tak duży wkład energetyczny sugeruje, że warstwa ta pełni ważne funkcje biologiczne. Warstwę S u CD tworzą w głównej mierze dwa białka - białko o dużej masie cząsteczkowej (HMW-SLP, 42-50 kDa) oraz białko o niskiej masie cząsteczkowej (LMW-SLP, 22-38 kDa) [201]. Oba białka powstają w wyniku obróbki potranslacyjnej pre-białka kodowanego przez gen *slpA* [202]. Białko SlpA składa się z trzech domen: N-terminalnej sekwencji sygnałowej, następnie regionu LMW o dużej zmienności oraz regionu HMW zawierającego dwa motywy wiążące białko do ściany komórkowej (CWB2 i PF04122) [203]. Sekwencja sygnałowa kieruje białko przez błonę komórkową na powierzchnię bakterii z użyciem przenośnikowego systemu Sec [204], po czym ulega cięciu przez proteazę Cwp84 [205], tworząc dwa osobne białka, które po związaniu się ze sobą stanowią dojrzałą warstwę S (**Rysunek 2**). Białko LMW jest ekspozycyjne do środowiska, zaś HMW wiąże białka macierzy pozakomórkowej, takie jak kolagen, witronektynę czy trombospondynę [206]. Nieznany jest mechanizm składania kompleksu białek HMW/LMW. Wszelkie próby stworzenia bakterii bez genu *slpA* zakończyły się niepowodzeniem, co utrudnia dokładne zbadanie tych mechanizmów oraz pełnionych przez te białka funkcji. Prawdopodobnie białka HMW/LMW pełnią funkcję adhezyjną, ponieważ są zaangażowane w wiązaniu komórek Hep-2 i komórek tkanki wyściełającej układ pokarmowy człowieka w badaniach *ex vivo* [206]. Co więcej, białka oddziałują na układ immunologiczny gospodarza. Białka warstwy S aktywują odpowiedź immunologiczną gospodarza przez receptor TLR4 [167], a przeciwciała na nie nakierowane, zostały wykryte w surowicy krwi ozdrowieńców [207]. Okazuje się, że profil produkowanych przez pacjentów przeciwciał anty-SLP jest podobny u pacjentów w trakcie CDI, bezobjawowych nosicieli CD oraz zdrowych ochotników. Inaczej w przypadku nawrotu zakażenia – pacjenci nie odpowiadali na zakażenie produkcją

przeciwciał IgM anty-SLP porównywalną do pacjentów w trakcie pierwszego zakażenia [208]. Ze względu na powyższe, białka te są badane pod kątem ich wykorzystania w szczepionkach. Podanie przeciwciał anty-SLP chomikom opóźniło moment śmierci powodowanej zakażeniem [209]. Jednakże, aktywna immunizacja tego samego modelu zwierzęcego oczyszczonymi białkami SLP w połączeniu z toksyną cholery, nie dała podobnych rezultatów [210]. Być może wynika to z dużej zmienności tych białek pomiędzy szczepami. Opisano, jak dotąd, 12 typów sekwencji białek SLP [211]. Potencjalna szczepionka musiałaby zapewnić ochronę w przypadku każdego z tych typów. Lepsze rezultaty otrzymano w przypadku szczepienia rektalnego myszy i chomików rekombinowanym prekurorem SlpA toksynotwórczego szczepu 630 [210]. Immunizacja pobudziła produkcję specyficznych przeciwciał IgA i IgG w obu modelach. W mysim modelu zakażenia, stwierdzono istotnie mniejszą kolonizację jelit, a w modelu z wykorzystaniem chomików, uzyskano częściową, ale za to krótkotrwałą ochronę przed CDI. Ta sama grupa badawcza podawała również myszom białko SlpA rektalnie wraz z białkiem FliC, jako adiuwantem, dzięki czemu uzyskano istotnie niższą kolonizację [212]. Jednakże, niedawno opisano fenotyp bakterii SLP-null (Av-CD 291.2), czyli pozbawiony białek Slp, okazał się on oporny na diffocin (silnie selektywny antybiotyk względem CD) i zdolny do kolonizacji układu pokarmowego chomików [213].

Inne białka brane pod uwagę pod kątem szczepionkowym to CwpV, Cwp13. Są to białka biorące udział w tworzeniu warstwy S, a ich zablokowanie mogłoby powodować zatrzymanie wzrostu bakterii już na bardzo wczesnym etapie inwazji. Brakuje jednak informacji na ten temat.

4.4.3.2.3. Adhezyny

Spośród białek tworzących warstwę S wyróżnia się szereg istotnych pod kątem immunologicznym białek o właściwościach adhezyjnych. Są to białka odpowiedzialne za wiązanie do komórek gospodarza lub elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Białka te są bardzo istotne w procesie inwazji bakterii.

Białko Cwp66 jest to białko szoku cieplnego i pełni rolę adhezyny. Składa się z dwóch domen: C-końcowej, eksponowanej, o dużej zmienności pomiędzy szczepami oraz N-końcowej, konserwatywnej kotwiczącej białko do ściany komórkowej bakterii [214]. Białko Cwp84 to proteaza biorąca udział w składaniu białek LMW i HMW SLP. Białko to jest eksponowane do środowiska, a jego sekwencja aminokwasowa silnie

konserwatywna wśród szczepów CD. W badaniach *in vitro* wykazano, że białko Cwp84 degraduje kolagen, fibronektynę i witronektynę, co może ułatwiać rozprzestrzenianie się bakterii [215]. Jednakże, mutanty pozbawione tego białka są równie wirulentne jak szczep dziki, oznacza to, że inne proteazy mogą zastępować jej funkcje [205]. Zbadano właściwości ochronne tego białka z użyciem modelu opartego o chomiki, poprzez szczepienie doodbytnicze zwierząt białkiem Cwp84 wraz z toksyną cholery jako adiuwantem, a następnie zakażenie CD. W grupie immunizowanej białkiem Cwp84 zwiększyła się przeżywalność zwierząt, a te, które przeżyły eksperyment, nie były skolonizowane przez CD [216]. Oba powyższe białka badano pod kątem ich potencjalnych właściwości szczepionkowych. C-końcowa domena białka Cwp66 oraz białko Cwp84 są immunogenne u ludzi. Poziom przeciwciał dla tych białek jest niższy u grupy chorych na CDI w porównaniu do grupy kontrolnej, co wskazuje na ich potencjalne właściwości ochronne [217,218]. CbpA to białko wiążące kolagen składające się z dwóch domen: N-końcowej odpowiedzialnej za wiązanie kolagenu oraz C-końcowej wiążącej ścianę komórkową CD. Mutant CD pozbawiony tego białka również wykazywał adhezję do kolagenu [219]. Inna adhezyna na powierzchni CD to białko Fbp68/FbpA. Jest to bardzo konserwatywne białko wiążące fibronektynę oraz komórki nabłonka [220]. Białko to ulega ekspresji w trakcie zakażenia i jest immunogenne u ludzi [217]. Lipoproteina CD0873, eksponowana na powierzchni komórki, wykazuje właściwości adhezyjne względem komórek linii Caco-2 (nabłonek jelita) oraz kolagenu. Mutanty pozbawione tego białka wykazują znacznie obniżoną adhezję do linii komórkowej Caco-2 [221]. GroEL to białko szoku cieplnego ułatwiające wiązanie do komórek nabłonkowych [220]. Wykazano właściwości ochronne przeciwciał anti-GroEL na modelu zwierzęcym, w którym wykorzystuje się chomiki [222]. Białko GroEL jest silnie konserwatywne u wielu szczepów CD, ale jednocześnie podobne białko występuje u innych szczepów tworzących zdrową mikrobiotę, przez co uniemożliwia jego użycie w szczepionce.

Wśród białek eksponowanych na powierzchni komórki, brak jest dobrych kandydatów na antygeny szczepionkowe, ze względu na zbyt dużą zmienność sekwencji pomiędzy szczepami lub wręcz odwrotnie – zbyt duży stopień homologii sekwencji aminokwasowej względem bakterii naturalnej flory jelitowej. Wyłączenie większości powyższych białek nie powoduje śmierci bakterii, zatem ich funkcje mogą być pełnione przez podobne białka.

4.4.3.2.4. Flagellum

Flagellum pełni u bakterii szereg funkcji: zapewnia możliwość aktywnego przemieszczania się w kierunku składników odżywczych, zwiększa adhezję do komórek gospodarza oraz tworzenie biofilmu. Flagellum zbudowane jest z części napędowej zakotwiczonej w błonie, haka oraz włókna, zbudowanego z białka flagelliny, wprowadzanego w ruch obrotowy. Składniki flagellum są modulatorami odpowiedzi immunologicznej, indukują produkcję cytokin prozapalnych poprzez aktywację receptorów TLR5 obecnych na komórkach gospodarza [223].

Większość szczepów CD ma możliwość aktywnego przemieszczania się, jednak liczba i lokalizacja flagellum jest zróżnicowana w obrębie szczepów CD. Istnieją również szczepy pozbawione *locus* F3 odpowiedzialnego za ekspresję wczesnych białek stanowiących flegellę, a co za tym idzie, niewytwarzające tego organellum. Takim przykładem jest szczep R20291 078, a efektem tej mutacji jest brak możliwości aktywnego przemieszczania się, co jednak nie powoduje zmniejszenia jego wirulencji [223]. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się dwa białka CD budujące flagellę, a mianowicie FliC – monomer włókna oraz FliD – stanowiące zakończenie włókna. Oba białka mają duży potencjał szczepionkowy, ponieważ silnie wzbudzają odpowiedź humoralną gospodarza [218]. Poziom przeciwciał anty-FliC i anty-FliD jest niższy u pacjentów z CDI, niż u osób ze zdrowej grupy kontrolnej. Flagellum pełni również dodatkowe funkcje, które jednak nie zostały jeszcze dokładnie opisane. Mutanty szczepu 630 pozbawione genów *fliC* i *fliD* wykazywały wyższą adhezję do komórek nabłonkowych jelita niż szczep dziki. Odwrotnie w przypadku mutanta szczepu R20291, adhezja do komórek nabłonkowych jelita była słabsza [224]. Białka flagelli oddziałują z receptorami TLR5 obecnymi na różnych typach komórek nabłonkowych, co prowadzi do zwiększonej produkcji CCL20 i IL-8. Uważa się, że flagellina wraz z toksynami CD, odpowiada za stan zapalny powstały w trakcie zakażenia [225]. Średni poziom przeciwciał anty-FliC i anty-FliD był niższy dla pacjentów z grupy CDI niż dla grupy kontrolnej [217]. Podanie dootrzewnowe myszom surowicy myszy immunizowanych flagelliną spowodowało wzrost przeżywalności myszy do 80% w czasie, gdy 4 na 5 myszy kontrolnych zmarło 3-7 dni po podaniu CD [226]. Podanie dootrzewnowe flagelliny izolowanej z *Salmonella* zapobiega zapaleniu okrężnicy wywoływanemu przez CD oraz utrzymuje integralność warstwy nabłonka. Profilaktyczne podanie flagelliny opóźnia ekspansję bakterii, obniża poziom apoptozy w komórkach nabłonkowych

i utrzymuje ich integralność. Flagellina podawana była przed, w trakcie i po zakażeniu, przez co prawdopodobnie wstępnie stymulowała receptor TLR5 i pobudziła wrodzony układ odpornościowy [227].

Podsumowując, jak dotąd nie opisano antygeny szczepionkowego, który spełniałby wszystkie wymagania stawiane szczepionce skierowanej przeciwko CD. Jednym z celów tej rozprawy doktorskiej jest znalezienie takich białek immunoreaktywnych, które mogłyby posłużyć, jako nowe antygeny w szczepionce przeciwko CD.

5. Cel pracy

Obecnie stosowane sposoby zapobiegania i leczenia zakażeń wywołanych przez *Clostridioides difficile* są niewystarczające, w związku z czym, istnieje potrzeba opracowywania nowych strategii terapeutycznych i profilaktycznych do walki z tymi zakażeniami. Nadrzędnym celem pracy było znalezienie nieopisanych, jak dotąd, epitopów białek *Clostridioides difficile*, które mogłyby być zastosowane w szczepionce lub do produkcji przeciwciał leczniczych. Kolejnym celem było zaprojektowanie, przygotowanie i scharakteryzowanie nowego adiuwantu do zastosowania w szczepionkach dośluzówkowych.

Cele szczegółowe mojej pracy doktorskiej to:

- pozyskanie szczepów klinicznych CD;
- identyfikacja nowych białek immunoreaktywnych CD;
- mapowanie sekwencji aminokwasowych białek CD celem identyfikacji fragmentów immunoreaktywnych, stworzenie bazy nowych epitopów;
- uzyskanie koniugatów epitopów z białkiem nośnikowym;
- synteza zestawu nanoadiuwantów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych;
- dokładna charakterystyka właściwości fizykochemicznych nanoadiuwantów;
- zbadanie właściwości biologicznych nanoadiuwantów w eksperymentach *in vitro*;
- analiza właściwości immunogennych protoszczepionki złożonej z koniugatu oraz nanoadiuwantu w badaniach *in vivo* z użyciem modelu mysiego.

6. Materiały i metody

6.1. Nowe epitopy *Clostridium difficile*

6.1.1. Odczynniki ogólne

Odczynniki ogólnego zastosowania użytkowane w badaniach, takie jak akrylamid, Tris, SDS (z ang. *Sodium Dodecyl Sulphate*, laurylosiarczan sodu), glicyna, β -merkaptoetanol, tiosiarczan sodu, węglan sodu, bromofenol, fosforan sodu (Na_3PO_4), zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Związki organiczne, takie jak metanol, kwas octowy, zostały zakupione w firmie Archem (Łany, Polska). 10% roztwór BSA (z ang. *Bovine Serum Albumin*, albumina surowicy wołowej) został zakupiony w Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Substraty dla alkalicznej fosfatazy NBT (z ang. *Nitro Blue Tetrazolium*, błękit nitrotetrazolowy) i BCIP (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*, 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan) zostały zakupione w firmie Roche (Bazylea, Szwajcaria).

Podłoże BHI (z ang. *Brain-Heart Infusion*) do hodowli *Clostridioides difficile* zakupiono w firmie Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA). Chlorowodorek L-cysteiny zakupiono w firmie Merck Millipore (Darmstadt, Niemcy).

Wszystkie związki organiczne, które posłużyły do syntezy peptydów, takie jak DMF (z ang. *Dimethylformamide*, dimetyloformamid), HOAt (z ang. *1-hydroxy-7-azabenzotriazole*, 1-hydroksy-7-azabenzotriazol), DIC (z ang. *N,N'-Diisopropylcarbodiimide*, N,N-diisopropylcarbodiimid), piperydyna, anizol, ditioetan, kwas trifluorooctowy, zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich. Płytki do syntezy peptydów (nr kat. MIA 10750001) oraz aminokwasy z zabezpieczonymi grupami bocznymi zostały zakupione w firmie Mimotopes (Mulgrave, Australia).

6.1.2. Szczepy CD i ich hodowla

W badaniach wykorzystano dwa szczepy kliniczne (CD20, CD27), przekazane w ramach współpracy naukowej z prof. dr hab. Gayane Martirosian z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Oba otrzymane szczepy kliniczne zostały zdeponowane w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerami: 2826 (CD20) oraz 2827 (CD27). Wykorzystano również szczep kontrolny R20219 zakupiony w kolekcji DSMZ (nr DSM, 27147). Szczepy pobrane od pacjentów zostały

scharakteryzowane przez zespół prof. Martirosian (**Tabela 3**). Próbkę kału posiano na medium selektywne CDIF - chromID™ (Columbia agar z cykloseryną, cefotaksyną i amfoterycyną B (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Francja)) i hodowano w komorze do beztlenowej hodowli bakterii A35 Whitley anaerobic Workstation (Don Whitley Scientific, Bingley, UK) przez co najmniej 48 godzin w 37 °C . Otrzymane kolonie badano pod kątem specyficznego „końskiego” zapachu, zielonej fluorescencji w świetle UV i barwiono metodą Grama. Dodatkowo, tożsamość kolonii potwierdzano z użyciem kart ANC w automatycznym systemie VITEK 2 Compact (BioMerieux). Potwierdzono produkcję toksyn u obu szczepów (TcdA, TcdB i toksyna binarna) z użyciem wcześniej opisanych metod [228]. Do realizacji celów tej pracy doktorskiej, bakterie hodowano w komorze do hodowli beztlenowej w płynnym podłożu BHI (z ang. *Brain Heart Infusion*) z dodatkiem 0,05% chlorowodoru L-cysteiny w 37 °C przez 48 godzin. Komórki bakteryjne zbierano poprzez wirowanie w 6000 x g przez 15 min (Heraeus, Thermo Fisher Scientific), a po dwukrotnym przepłukaniu w PBS pH 7,4 (z ang. *Phosphate-Buffered Saline*, buforowany roztwór soli fizjologicznej) były użyte do dalszych eksperymentów.

Tabela 3 Dane dotyczące użytych szczepów klinicznych.

	Cd20	Cd27
Pochodzenie	próbka kału 71-letniego pacjenta	próbka kału 64-letniej pacjentki
Rybotyp	027	027
Produkowane toksyny	TcdA, TcdB i toksyna binarna	TcdA, TcdB i toksyna binarna
Wrażliwość na antybiotyki	metronidazol, wankomycyna, klindamycyna, benzylpenicylina, rifampicyna, amoksycylina z kwasem klawulanowym, piperacylina z tazobaktamem	metronidazol, wankomycyna, klindamycyna, benzylpenicylina, rifampicyna, amoksycylina z kwasem klawulanowym, piperacylina z tazobaktamem
Oporność na antybiotyki	moksyflokscyna, ciprofloksacyna, erytromycyna, imipenem	moksyflokscyna, ciprofloksacyna, erytromycyna, imipenem
Numer PCM	2826	2827

6.1.3. Opis stosowanych surowic

Surowice krwi obwodowej pacjentów

W badaniach wykorzystano surowice krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowanym CDI ($n = 9$). Za kwalifikację pacjentów i zbiór surowic odpowiedzialny był prof. dr hab. Andrzej Szuba z IV Szpitala Wojskowego z Polikliniką we Wrocławiu. Próbkę została pobrana od pacjentów, którzy wyrazili na to pisemną zgodę. Badania z wykorzystaniem surowic pacjentów uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr zgody KB-631/2015) i zostały przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską z 1975 roku. Kwalifikacja pacjentów grupy CDI została oparta o rozpoznanie typowych objawów zakażenia CD, które obejmowały wystąpienie więcej niż trzech luźnych stolców w ciągu 24 godzin, ból brzucha, gorączkę i pozytywny wynik badania na obecność dehydrogenazy glutaminowej oraz toksyn TcdA i TcdB (C. Diff Quik Chek Complete; TECHLAB, Blacksburg, USA) [140]. Dane demograficzne pacjentów oraz opis chorób towarzyszących zostały zebrane w **Tabeli 4**. Do identyfikacji nowych białek immunoreaktywnych użyto surowic pojedynczych pacjentów. Do testów immunoenzymatycznych używano mieszaniny wszystkich surowic grupy pacjentów z CDI. Celem otrzymania mieszaniny surowic, pojedyncze surowice, po inaktywacji w 56 °C przez 30 min, połączono ze sobą w stosunku 1:1. Mieszaninę surowic rozporcjowano i przechowywano w -20 °C.

Tabela 4 Opis surowic pacjentów z CDI użytych w badaniach.

NR	PLEĆ	WIEK	DODATKOWY OPIS PACJENTA
1	K	65	Nieleczona cukrzyca typu 2 z powikłaniami, otyłość, nadciśnienie, stłuszczenie wątroby.
2	K	95	Choroba Parkinsona, nadciśnienie, miażdżyca, zakażenie układu moczowego, stan po appendektomii, napady migotania przedsionków. Wystąpienie CDI w wyniku stosowania amoksycyliny z kwasem klawulanowym.
3	K	60	Owrzodzenie kończyny dolnej, nadciśnienie, cukrzyca typu 2, stan po histerektomii, ciężki niedobór witaminy D, otyłość.
4	M	72	Posocznica – <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp pneumoniae, miażdżyca, nadciśnienie, cukrzyca typu 2, kamica nerkowa, polipy w jelitach, infekcja układu moczowego. Wystąpienie CDI w wyniku leczenia antybiotykowego posocznicy.
5	K	82	Krwawienie z przewodu pokarmowego, zapalenie oskrzeli. Wystąpienie CDI prawdopodobnie w wyniku kuracji cefalosporynami.
6	K	68	Liczne schorzenia kardiologiczne i operacje, niedokrwistość, miażdżyca, napadowe migotanie przedsionków, padaczka, stan po zapaleniu płuc, stan po amputacji kończyny, palenie papierosów.
7	K	77	Nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, nadczynność tarczycy, przewlekła choroba nerek.
8	M	60	Zespół metaboliczny: cukrzyca typu 2, otyłość, nadciśnienie, hiperlipidemia, stan po zawale, POChP, zaćma, kamica, stan po ostrym zapaleniu trzustki.
9	M	77	Cukrzyca typu 2, zakażenie układu moczowego, zapalenie płuc, nadciśnienie, liczne schorzenia kardiologiczne.

Użyte skróty: K – kobieta, M – mężczyzna; wiek podany w latach.

Surowice grupy zdrowej

Surowice krwi obwodowej grupy zdrowej ($n = 10$) pochodzą z kolekcji Laboratoryjnej. Zgoda na wykorzystanie surowic w badaniach została wydana przez Komisję Bioetyczną przy Wrocławskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody KB-631/2015). Do testów immunoenzymatycznych używano mieszaniny wszystkich surowic grupy zdrowej. Celem otrzymania mieszaniny surowic, pojedyncze surowice, po

inaktywacji w 56 °C przez 30 min, połączono ze sobą w stosunku 1:1. Mieszaninę surowic rozporcjowano i przechowywano w -20 °C.

Surowice krwi pępowinowej

Surowice krwi pępowinowej ($n = 10$) zostały pobrane od zdrowych kobiet w Klinice Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Próbkę zostały pobrane od pacjentek, które wyraziły na to pisemną zgodę. Badania z wykorzystaniem surowic pacjentek uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr zgody KB-882/2012) i zostały przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską z 1975 roku. Dane demograficzne pacjentek oraz opis chorób towarzyszących zostały zebrane w **Tabeli 5**. Do testów immunoenzymatycznych używano mieszaniny wszystkich surowic krwi pępowinowej. Celem otrzymania mieszaniny surowic, pojedyncze surowice, po inaktywacji w 56 °C przez 30 min, połączono ze sobą w stosunku 1:1. Mieszaninę surowic rozporcjowano i przechowywano w -20 °C.

Tabela 5 Opis surowic krwi pępowinowej.

NR	WIEK [LAT]	OPIS
1	28	Poród przez cesarskie cięcie
2	33	Poród naturalny
3	38	Poród naturalny
4	37	Poród naturalny
5	30	Poród naturalny, choroba von Willebranda
6	25	Poród naturalny
7	31	Poród naturalny
8	36	Poród naturalny, cukrzyca
9	23	Poród naturalny
10	36	Poród przez cesarskie cięcie

6.1.4. Izolacja i identyfikacja białek immunoreaktywnych

Izolacja białek

Białka powierzchniowe bakterii zostały wyizolowane z użyciem metody „delikatnego zmywania” białek z powierzchni komórki bakteryjnej, w której stosuje się roztwór wodny 1 M chlorku litu [3]. 1 g masy bakteryjnej zawieszono w 7 ml świeżo przygotowanego roztworu 1 M LiCl, a następnie mieszaninę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, z mieszaniem. Mieszaninę zwirowano 6000 x g przez 5 min (Heraeus Contifuge Stratus, Thermo Fisher Scientific). Zebrano supernatant i dializowano go do wody MQ przez 24 godziny w membranach dializacyjnych ZelluTrans (Roth, Karlsruhe, Niemcy), o parametrze odcięcia mas cząsteczkowych równym 6,5 kDa. Roztwór białek po dializie został zatężony z użyciem filtra Amicon Ultra (Thermo Fisher Scientific) o parametrze odcięcia mas cząsteczkowych równym 10 kDa, według wytycznych producenta. Stężenie białek określono z użyciem zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) według wytycznych producenta. W ten sposób przygotowane próbki białek powierzchniowych CD podzielono na mniejsze porcje i przechowywano w -20 °C.

Elektroforeza SDS-PAGE

Profil wyizolowanych białek zbadano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) według Laemmli i wsp. [229], ze zmianami. Do elektroforezy użyto żeli poliakrylamidowych (5-12,5%) o wymiarach 18 x 16 cm, grubości grzebienia 1,5 mm. Elektroforezę rozwijano z użyciem urządzenia SE600 Standard Dual Cooled Vertical Unit (Hoefer, Holliston, USA). Bufor użyty w elektroforezie składał się z 0,025 M Tris, 0,192 M glicyny i 0,1% SDS, pH 8,3. Białka przed elektroforezą poddano denaturacji w buforze Laemmli z SDS w 95 °C przez 5 min. Każdorazowo наносzono po 30 µg zdenaturowanego białka na ścieżkę oraz 10 µl białkowego markera mas (Precision Plus Dual Color, Bio-Rad). Elektroforezę prowadzono przez 5 godzin przy 150 V z ciągłym chłodzeniem. Żele po elektroforezie były poddawane analizie Western blot lub barwione metodą srebrową celem uwidocznienia białek.

Metoda srebrowa

Barwienie żelu po SDS-PAGE z użyciem „metody srebrowej” zostało przeprowadzone według Shevchenko i wsp. [230]. Metoda ta jest dostosowana do

następującej po niej identyfikacji białek metodą spektrometrii mas. Wszystkie odczynniki zostały przygotowane na chwilę przed użyciem. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie został utrwalony w 5% kwasie octowym i 50% metanolu przez 1 godzinę, następnie przepłukany w 50% metanolu i wodzie MQ, inkubowany 3 min w 0,02% roztworze wodnym tiosiarczanu sodu, przepłukany w wodzie MQ, inkubowany przez 45 min w 0,15% roztworze wodnym azotanu sodu, przepłukany wodą MQ. Reakcja barwna została wywołana poprzez dodanie roztworu 2% węgla sodu w 0,04% formaldehydzie. Po uwidocznieniu prążków białkowych reakcję zatrzymano przez dodanie 5% kwasu octowego. Celem uniknięcia zanieczyszczenia próbek, odpowiednie prążki zostały wycięte z żelu zaraz po jego wywołaniu. Dokumentacja żelu została wykonana z użyciem Gel Doc™ (Bio-Rad, Hercules, USA).

Western blot

Immunoreaktywność rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym białek została zbadana z użyciem metody Western blot [231]. Żel po elektroforezie SDS-PAGE inkubowano w buforze do transferu (10 mM Tris-HCl, 150 mM glicyna, 20% metanol, pH 8,3) przez 30 min, a następnie poddano transferowi w warunkach półsuchych na membranę PVDF Immobilon P (Merck Millipore) z użyciem systemu Trans Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Warunki, w jakich został przeprowadzony transfer, to 25 V przez 60 min. Celem zbadania wydajności transferu pozostały żel poliakrylamidowy wybarwiono metodą srebrową i oszacowano stopień przeniesienia barwnego markera mas z żelu na membranę PVDF. Zablockowano wolne miejsca na membranie PVDF roztworem 1% BSA w buforze TBS (z ang. *Tris Buffered Saline*, sól fizjologiczna buforowana solą Trisu) o składzie 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, pH 7,5 z dodatkiem 0,1% Tween®20 (TBS-T) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Dodano przeciwciała I-rzędowe (surowica krwi wybranej grupy) w rozcieńczeniu 1:100 w buforze TBS-T z dodatkiem 0,1% BSA i inkubowano membranę przez noc w 4 °C, z mieszaniem. Następnie membranę płukano 3-krotnie w TBS-T, każdorazowo przez 10 min celem usunięcia niezwiązanych przeciwciał. W kolejnym kroku dodano II-rzędowe przeciwciała anty-ludzkie IgG koniugowane z alkaliczną fosfatazą, (nr kat. A1543-1ml, Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:10 000 w buforze TBS-T i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Przeprowadzono kolejne płukanie jak powyżej, a następnie wywołano reakcję barwną przez dodanie substratu dla fosfatazy alkalicznej w postaci mieszaniny NBT/BCIP (0,4 mg/ml NBT (błękit nitrotetrazoliowy),

0,19 mg/ml BCIP (fosforan bromochloroindolilu)). Reakcja została przerwana poprzez płukanie w wodzie MQ. Dokumentacja membrany została wykonana z użyciem Gel Doc™.

Identyfikacja białka

Białka wycięte z żelu poliakrylamidowego poddawane były trawieniu trypsyną, a następnie rozdzielano mieszaninę otrzymanych peptydów z użyciem chromatografii cieczowej i identyfikowano je z wykorzystaniem spektrometrii mas (LC-MS-MS/MS Orbitrap). Masy otrzymanych peptydów zostały porównane z bazami, takimi jak NCBI, UniProt przy użyciu programu MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>). Wszystkie przeszukania w bazie zostały przeprowadzone pod kątem białek *Peptoclostridium difficile*. Identyfikacja została przeprowadzona w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

6.1.5. Analiza bioinformatyczna białka Cwp22

Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej

Sekwencja białka Cwp22 (WP_009890957) została sprawdzona pod kątem podobieństwa sekwencji aminokwasowej u szczepów CD oraz u innych szczepów bakteryjnych z użyciem narzędzia Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) na serwerze National Center for Biotechnology Information (NCBI) [232]. BLAST jest ogólnodostępnym narzędziem bioinformatycznym do lokalnego przyrównywania sekwencji z wykorzystaniem metod heurystycznych. Poszukiwano w bazach NCBI danych dla szczepów wytypowanych przez program (źródło pochodzenia, profil toksynotwórczości, ewentualna hiperwirulentność).

Modelowanie struktury białka

Nie udało się stworzyć wiarygodnego modelu 3D białka Cwp22 z uwagi na brak białek o odpowiednio wysokim podobieństwie sekwencji, które posiadałyby rozwiązana strukturę krystaliczną. Analiza sekwencji aminokwasowej pod kątem struktury białka została oparta o identyfikację konserwatywnych domen (program BLAST) oraz o modelowanie struktury II-rzędowej z użyciem narzędzia bioinformatycznego PredictProtein (Uniwersytet Techniczny w Monachium, <https://www.predictprotein.org/>) [233]. Jest to narzędzie korzystające z danych ponad 20 baz, które z dużym

prawdopodobieństwem przewiduje strukturę II-rzędową białka. Użyta sekwencja wejściowa białka Cwp22 to WP_009890957.

Przewidywanie epitopów dla limfocytów

Liniowe epitopy dla limfocytów B zostały przewidziane z użyciem dwóch programów bioinformatycznych BEPIPred (Duński Uniwersytet Techniczny, <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) [234] oraz BCPred (Uniwersytet Stanowy Pensylwanii, <http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>) [235]. Użyte narzędzia różnią się pod kątem stosowanych algorytmów i dlatego spodziewano się uzyskać uzupełniające się rezultaty. Użyta w tej analizie sekwencja wejściowa białka Cwp22 to WP_009890957.

Liniowe epitopy dla limfocytów T również zostały przewidziane z użyciem narzędzia online TepiTool (serwer Immune Epitope Database and Analysis Resource, IEDB, <http://tools.iedb.org/tepitool/>). Bazę przeszukiwano biorąc pod uwagę 27 najczęściej występujących u ludzi (wyselekcjonowanych przez program TepiTool) alleli głównego układu zgodności tkankowej. Użyta w tej analizie sekwencja wejściowa białka Cwp22 to WP_009890957.

Wyniki przewidywań oraz stworzone modele strukturalne białek zostały użyte do zaprojektowania zestawu potencjalnych epitopów. W sekwencji białka zaznaczono aminokwasy wytypowane przez narzędzia bioinformatyczne jako potencjalne epitopy. Poza sekwencjami zaproponowanymi przez programy do przewidywania epitopów pod uwagę wzięto również strukturę II-rzędową oraz eksponowane fragmenty białka. W wyborze sekwencji kierowano się głównie tym, aby zablokować funkcję białka Cwp22, dlatego skupiono się na regionie odpowiedzialnym za aktywność transpeptydazy. 16-aminokwasowe sekwencje, które pokrywają się z sekwencjami potencjalnych epitopów i eksponowanych pętli wytypowano jako peptydy do syntezy chemicznej.

6.1.6. Metoda PEPSCAN

Chemiczna synteza peptydów

Peptydy zostały zsyntezowane z użyciem techniki PEPSCAN [236], ze zmianami. Peptydy syntezowano na polietylenowych bolcach typu NCP (nr kat. MIA 10750001, Mimotopes, Australia) poprzez dodawanie pojedynczych aminokwasów w reakcji sprzęgania z użyciem płytki 96-dołkowej. Do syntezy posłużyły F-moc pochodne aminokwasów z zablokowanymi grupami bocznymi (Mimotopes, Australia). W pierwszym kroku, bolce poddano deprotekcji w 20% roztworze piperydyny w DMF

przez 1 godzinę w szczelnie zamkniętym naczyniu. Następnie po płukaniu przez 2 min w DMF i 4 x 1 min w metanolu osuszono bolce przez 1 godzinę pod wyciągiem. Przeprowadzono reakcję sprzęgania zanurzając bolce w 100 µl roztworu 60 mM aminokwasu zawieszonym w 60 mM DIC i 65 mM HOAt w DMF. Przebieg reakcji monitorowano poprzez dodatek 0,5 mM bromofenolu – odbarwienie roztworu świadczyło o zakończeniu reakcji sprzęgania (zwykle po około 4 godzinach). Reakcja była prowadzona w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętym pojemniku celem zapobieżenia parowania roztworu. Po odmyciu niezwiązanych aminokwasów metanolem (1 x 5 min), osuszeniu i inkubacji przez 5 min w DMF bolce poddawano kolejnej reakcji deprotekcji i sprzęgania, aż do otrzymania peptydu o zadanej długości sekwencji. Następnie peptydy poddawano reakcji deprotekcji celem usunięcia związków chemicznych blokujących grupy boczne w roztworze 2,5% anizolu i 2,5% ditioetanu w kwasie trifluoroctowym. Po końcowym płukaniu (metanol 1 x 10 min, następnie roztwór 0,5 % kwasu octowego w 50% metanolu w wodzie 1 x 1 godzina, następnie metanol 2 x 2 min) i osuszeniu, bolce ze związanymi peptydami były przechowywane szczelnie zamknięte w -20 °C.

Po syntezie pełnego peptydu oraz po każdej analizie metodą immunoenzymatyczną przeprowadzano dysrupcję bolców celem ich oczyszczenia ze związanych przeciwciał. Bufor do dysrupcji składał się z wodnego roztworu 1% SDS, 0,1% β-merkaptioetanolu, 0,1 M fosforanu sodu o pH 7,2. Sonikator wypełniono ogrzany do 55-65 °C buforem do dysrupcji. Bolce polietylenowe zanurzono w roztworze do dysrupcji bolcami do dołu i poddawano sonikacji przez 10 min (7kW/25kHz). Po dysrupcji bolce płukano przez 10 min w rozgrzanej do 65 °C wodzie MQ, a następnie 1 x 10 min w metanolu o tej samej temperaturze. Bolce osuszono i przechowywano w -20 °C.

Test immunoenzymatyczny z użyciem peptydów syntezowanych na polietylenowych bolcach

Zbadano immunoreaktywność otrzymanych peptydów z użyciem metody immunoenzymatycznej ELISA [237]. W teście wykorzystano surowice pacjentów w trakcie pierwszego zakażenia, surowice krwi pępowinowej oraz surowice kontrolne, czyli pobrane od zdrowych ochotników. W pierwszym kroku bolce zostały rozmrożone i zrównoważone w roztworze TBS-T przez 10 min w temperaturze pokojowej. Na bolcach zostały zablokowane wolne miejsca poprzez ich inkubację w 1% roztworze BSA

w TBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Surowice badanych grup stosowano w rozcieńczeniu 1:1000 w TBS-T. Bolce inkubowano w roztworze surowicy przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Przeciwciała drugorzędowe anty-ludzkie IgG skoniugowane z alkaliczną fosfatazą stosowano w rozcieńczeniu 1:10000 w roztworze TBS-T, bolce inkubowano w roztworze przeciwciał II-rzędowych przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Reakcję barwną wywoływano przez 30 min z użyciem substratu dla fosfatazy – AP Yellow (Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate System (nr kat. P7998, Sigma-Aldrich)). Po oznaczeniu absorbancji przy 405 nm (PowerWave HT, BioTek Instruments, Winooski, USA) przeciwciała były zmywane z bolców poprzez 10 minutową sonikację w roztworze do dysrupcji. Po przepłukaniu bolców w wodzie o temperaturze 60 °C (1 x 10 min) i metanolu o temperaturze 60 °C (1 x 10 min) bolce zostały osuszone i zamrożone w -20 °C. Każdy test został powtórzony, co najmniej czterokrotnie.

Analiza wyników immunoreaktywności peptydów syntezowanych na polietylenowych pinach, według Carter i inni, polega na wyliczeniu średniej dla 25% najniższych odczytów i oznaczenie tej wartości jako poziomu tła. Wszystkie odczyty powyżej tej liczby są odczytami pozytywnymi [236]. W tej pracy, zastosowano zastrzone reguły wyliczania poziomu tła - poziom tła wyznacza średnia 50% odczytów o najniższym wyniku.

6.1.7. Identyfikacja i charakterystyka epitopu

Identyfikacja epitopu

Wybrane immunoreaktywne 16-aminokwasowe sekwencje zostały następnie poddane dalszej analizie – syntezowano skrócone peptydy od strony N- i C-końca. Badano immunoreaktywność skróconych sekwencji i tym samym identyfikowano epitopy.

Charakterystyka epitopu

Modelowano strukturę przestrzenną peptydu z użyciem programu PEP-FOLD [238], oraz wyliczono z użyciem narzędzia bioinformatycznego (PepCalc [239]) dane, takie jak: masa cząsteczkowa, rozpuszczalność peptydu, pI, ładunek w pH fizjologicznym.

Analiza epitopów pod kątem ich rozpowszechnienia i autoimmunoreaktywności

Przeszukano bazę IEDB (<https://www.iedb.org/>) [240] celem weryfikacji czy otrzymane epitopy znajdują się w bazie znanych epitopów. Przeszukano bazę wszystkich organizmów, zakładając podobieństwo sekwencji nie mniejsze niż 70%, pod uwagę wzięto wszystkie klasy MHC. Przeszukano również bazę ludzkich autoantygenów AAgAtlas database 1.0 (<http://biokb.ncpsb.org/aagatlas>) [241] celem weryfikacji czy sekwencje mogą być potencjalnie autoimmunoreaktywne.

6.1.8. Przygotowanie koniugatów peptydów z białkiem nośnikowym

Koniugacja peptydów z KLH

Peptydy otrzymano z komercyjnego źródła (JPT Peptides Technology, Niemcy). Do sekwencji każdego z peptydów dodano cysteinę (na C-końcu sekwencji), która jest niezbędna w procesie koniugacji. Koniugację peptydów z białkiem nośnikowym KLH przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawu Imject™ Maleimide-Activated mcKLH Spin Kit (nr kat. 77666, Thermo Fisher Scientific). Zestaw pozwala na koniugację haptenu zawierającego grupę sulfhydrylową (-SH, pochodząca od cysteiny) z aktywowanym białkiem mcKLH (z ang. *mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin*) oraz oczyszczenie koniugatu z wykorzystaniem kolumniek chromatograficznych wypełnionych krzemionką. McKLH to białko izolowane ze skorupiaka *Megathura crenulata*, indukuje bardzo wysokie miano przeciwciał względem koniugowanego haptenu. W skład zestawu wchodzi aktywowane białko KLH, bufor do koniugacji, bufor i kolumniki do oczyszczania koniugatu. Przed koniugacją peptydy (2 mg) zakończone cysteiną zostały poddane reakcji redukcji z użyciem żelu z immobilizowaną na nim trójalkilofosfiną (nr kat. 77712, Thermo Fisher Scientific). Następnie zostały poddane reakcji koniugacji z aktywowanym białkiem mcKLH (2 mg) w buforze do koniugacji przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z mieszaniem. W kolejnym kroku oddzielono koniugat od wolnego haptenu z jednoczesnym odsoleniem i usunięciem EDTA oraz pozostałości azydku sodu z użyciem kolumniek załączonych do zestawu. Zebrane frakcje koniugatów zostały podzielone na mniejsze porcje i zamrożone w -20 °C.

Analiza koniugatów

Celem potwierdzenia koniugacji peptydu z KLH zbadano absorbancję samych peptydów, białka mcKLH użytego w procesie koniugacji i otrzymanych koniugatów

w zakresie długości fali światła 190-400 nm [242]. Wszystkie badane związki były zawieszane w buforze do elucji koniugatów z kolumny, który znajdował się w zestawie do koniugacji. Analizę wykonano na spektrometrze DS-11+ (DeNovix, Wilmington, USA) w trybie nanodrop.

6.2. Badania nad kandydatami na nanoadiuwanty (NAC)

6.2.1. Odczynniki ogólne

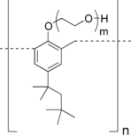
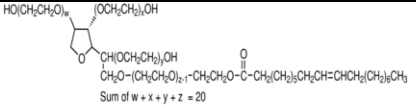
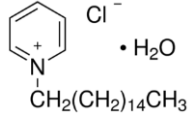
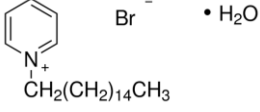
Detergenty jonowe i niejonowe, olej silikonowy, mrówczan etylu, owoalbumina (grade V, nr kat. A5503), mucyna (typ III izolowany z żołądka świni, nr kat. M1778) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. Etanol zakupiono w firmie Avantor Performance Materials (Gliwice, Polska). HEPES (z ang. *(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) zakupiono w firmie Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Niemcy). Wszystkie roztwory zostały przygotowane z użyciem wody MQ. Stężenie białka oznaczano z użyciem zestawu BCA Protein Assay Kit firmy Thermo Fisher Scientific. Wszystkie zastosowane media do hodowli linii komórkowych i dodatki do hodowli były marki Gibco (Thermo Fisher Scientific).

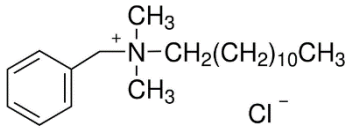
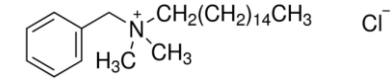
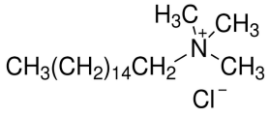
6.2.2. Skład i przygotowanie nanoadiuwantów

Potencjalne nanoadiuwanty (NAC) zostały przygotowane z użyciem oleju silikonowego, detergentów o ładunku dodatnim, detergentów niejonowych, rozpuszczalników organicznych i wody ultraczystej. Olej silikonowy (PDMS) stanowi 65% składu NAC, jest on nietoksycznym polimerem, szeroko stosowanym w produkcji kosmetyków, farmaceutyków i żywności. PDMS jest wydalany z organizmu razem z kałem w niezmienionej postaci, nie jest mutagenny w modelach *in vitro* oraz nie stwierdzono efektów ubocznych jego inhalacji [243]. Jako detergenty niejonowe zastosowano Tyloxapol lub Tween80[®], oba związki są stosowane powszechnie w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym. Każdy NAC ma w swoim składzie detergent kationowy, jeden z pięciu wymienionych: BDMDDAC, BDMHDAC, CBP, CPC i CTMAC. W Tabeli 6 zamieszczono pełne nazwy, struktury chemiczne oraz opisano podstawowe właściwości użytych do produkcji NAC detergentów. Pozostałe składniki NAC stanowią: etanol, aceton lub mrówczan etylu oraz woda ultraczysta. Wszystkie

składniki użyte do produkcji nanoadiuwantów znajdują się na liście Agencji Żywności i Leków (*FDA*) produktów bezpiecznych w użyciu.

Tabela 6 Lista zastosowanych detergentów.

Nazwa	Nazwa pełna (IUPAC)	Struktura chemiczna	Ładunek	CMC	LD50	Wykorzystanie w medycynie i przemyśle
	Tyloxapol		brak	0,018 M	5000 mg/kg doustnie u szczura	stosowany w środkach wziewnych do rozrzedzania wydzieliny płuc
	Tween80® (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	 Sum of w + x + y + z = 20	brak	0,012 M	25000 mg/kg doustnie u myszy	stosowany jako emulsyfikator w pożywieniu, detergent w środkach czyszczących, obecny w szczepionkach
CPC	chlorek cetylopyrydynowy (1-hexadecylpyridinium chloride)	 Cl ⁻ • H ₂ O	dodatni	0,00012 M	36 mg/kg doustnie u królików	działanie antyseptyczne, stosowany w pastach do zębów, płynów do płukania jamy ustnej, kropli do nosa
CBP	bromek cetylopyrydynowy (1-hexadecylpyridinium bromide)	 Br ⁻ • H ₂ O	dodatni	0,0009 M	brak danych	stosowany w dezodorantach, ma właściwości bakteriobójcze

BDMDDAC	benzylodimetyldodecylammonium chloride (<i>benzyl-dodecyl-dimethylazanium chloride</i>)		dodatni	brak danych	400 mg/kg doustnie u szczura	działanie bakteriobójcze, stosowane w kosmetykach
BDMHDAC	benzylodimetylhexadecylammonium chloride (<i>benzyl-hexadecyl-dimethylazanium chloride</i>)		dodatni	brak danych	398 mg/kg doustnie u szczura	działanie bakteriobójcze, stosowane w kosmetykach
CTMAC	chlorek cetrymonium (<i>hexadecyl-trimethylammonium chloride</i>)		dodatni	0,0016 M	400 mg/kg doustnie u myszy	stosowany w kosmetykach, głównie odżywkach do włosów i szamponach

Nazwy detergentów w nawiasach to nazwy zalecane przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC). Stosowane skróty: LD50 - dawka powodująca śmierć 50% zwierząt, CMC – krytyczne stężenie micelizacji. Dane pobrane ze stron internetowych producentów.

Na nanoadiuwant składają się (w/v): 65% oleju, 5% detergentu niejonowego, 1% detergentu kationowego, 8% rozpuszczalnika organicznego i 21% wody ultraczystej. Wszystkie składniki zostały podgrzane do 65 °C, a następnie zostały poddane emulsyfikacji pod wysokim ciśnieniem. Tak przygotowane nanoadiuwanty rozcieńczono wodą MQ do stężenia 60% (w/v) i przechowywano w szklanych, szczelnie zamkniętych pojemnikach (nr kat. 9003482 i 6242267 LLG, Meckenheim, Niemcy) w lodówce. NAC, które przez co najmniej tydzień, nie uległy degradacji, poddawano dalszym testom. W ten sposób używając kombinacji wszystkich wymienionych składników otrzymano 13 stabilnych NAC (**Tabela 7**).

Otrzymane NAC zostały poddane dalszej charakterystyce fizykochemicznej. Badania fizykochemiczne opisane poniżej były prowadzone w ciągu czterech lat na nanoadiuwantach, które nie wykazywały oznak rozpadu emulsji. W razie zaobserwowania oznak starzenia się emulsji (rozdział faz, znaczne zwiększenie wielkości kropeł i spadek potencjału zeta) przygotowywano nowy preparat. Z tego też względu wyjściowe parametry emulsji, takie jak wielkość kropeł i potencjał zeta mogą się różnić w przypadku poszczególnych eksperymentów.

Tabela 7 Skład uzyskanych stabilnych nanoadiuwantów, których podstawę stanowi PDMS (65% mieszaniny).

	Rozpuszczalnik organiczny			Detergent niejonowy		Detergent kationowy				
	etanol	aceton	mrówczan etylu	Tween80 [®]	Tyloxapol	CPC	CBP	BDMDDAC	BDMHDAC	CTMAC
NAC1	X			X			X			
NAC2	X				X					X
NAC3		X			X			X		
NAC4	X			X				X		
NAC5		X		X					X	
NAC6			X		X			X		
NAC7	X				X			X		
NAC8	X			X						X
NAC9	X			X		X				
NAC10	X			X					X	
NAC11		X		X				X		
NAC12			X	X				X		
NAC13	X				X		X			

6.2.3. Pomiary wielkości i ładunku kropeł NAC

Do charakterystyki nanoadiuwantów wykorzystano szeroko stosowane techniki analizy układów rozproszonych, takie jak dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, z ang. *Dynamic Light Scattering*) [244], oraz elektroforetyczne pochłanianie światła (ELS, z ang. *Electrophoretic Light Scattering*) [245]. DLS służy do pomiaru wielkości cząstek zdyspergowanych cieczy. Próbkę oświetlana jest wiązką lasera, która następnie ulega rozproszeniu i pada na detektor. Detektor mierzy stopień rozproszenia wiązki lasera, co przeliczane jest na wielkość badanych cząstek podawaną w nanometrach. Dodatkowo, w trakcie pomiaru DLS, mierzona jest polidispersyjność cząstek (PDI, z ang. *Polydispersity Index*). PDI określa statystyczny rozrzut wielkości cząstek. ELS to technika służąca do pomiaru ładunku powierzchniowego cząstek. Naładowane krople NAC poddawane są działaniu pola elektrycznego. Prędkość ruchu w polu elektrycznym zależy od ładunku cząstek i nazywana jest ruchliwością elektroforetyczną. Ruchliwość elektroforetyczna przeliczana jest na jednostki potencjału zeta (ZP, z ang. *Zeta Potential*).

Zarówno pomiar wielkości cząstek jak i potencjał zeta oznaczone zostały z użyciem przyrządu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), w dedykowanych kuwetach wyposażonych w elektrody (Folded Capillary Zeta Cell, Malvern nr kat. DTS1070). Próbkę przed każdym badaniem rozcieńczano do stężenia 0,1% (v/v) w buforze HEPES o pH 7. Do badań korelacji pomiędzy rozmiarem kropeł lub ich potencjałem zeta, a ich składem chemicznym użyto testu korelacji Pearsona [246].

6.2.4. Długotrwała stabilność NAC

Zbadano stabilność NAC poprzez pomiary zmian wielkości cząstek, parametru PDI i potencjału zeta nanoadiuwantów na skutek ich długotrwałego przechowywania. Wielkość i polidispersyjność cząstek oraz ZP nanoadiuwantów zostały zmierzone w następujących punktach czasowych: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 miesięcy. W trakcie trwania eksperymentu próbki były przechowywane w warunkach chłodniczych.

6.2.5. Interakcja nanoadiuwantu i mucyny

Mucyna jest ujemnie naładowanym białkiem, wyściełającym drogi oddechowe. Do eksperymentów użyto mucyny typu III izolowanej z żołądka świni. Mucyna została poddana uwodnieniu w 1 mM HEPES o pH 7 w stężeniu 1 mg/ml, przez 1 godzinę

w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Uwodnioną mucynę dodano do 0,1% NAC (stężenie końcowe 47,6 µg/ml) i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej mieszając. W kolejnym kroku zbadano wielkość cząstek NAC i ich potencjał zeta. Wynik pomiarów porównano z wynikiem otrzymanym dla NAC bez mucyny.

6.2.6. Interakcja nanoadiuwantu i owoalbuminy

Oddziaływanie nanoadiuwantu i owoalbuminy (OVA) zbadano w dwóch typach eksperymentów. Zbadano jak dodatek owoalbuminy zmienia charakterystykę kropeł nanoadiuwantu (wielkość kropeł i ZP) oraz wiązanie się NAC z owoalbuminą.

Owoalbumina jest dobrze opisanym w literaturze białkiem, często stosowanym jako białko modelowe, szczególnie w badaniach nowych nośników szczepionek [247–249]. Owoalbumina została poddana uwodnieniu w stężeniu 10 mg/ml w 1 mM HEPES o pH 7 w temperaturze pokojowej przez 30 min, z mieszaniem. Następnie, OVA została dodana do 60% NAC i końcowo uzyskano stężenie OVA równe 1 mg/ml w 20% NAC. W pH 7 OVA ma wypadkowy ładunek ujemny ($pH > pI$, $pI = 4,5$) [250]. Mieszaninę inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Bezpośrednio przed pomiarem mieszanina została rozcieńczona przy użyciu 1 mM HEPES do stężenia NAC równego 0,1%. Zmierzono wielkość kropeł i potencjał zeta mieszaniny NAC i OVA oraz samego NAC.

Zbadano czy nanoadiuwant wiąże się z owoalbuminą. Użyto metody pośredniej, w której oznacza się zawartość OVA w supernatancie pozostałym po przefiltrowaniu mieszaniny NAC i OVA [251]. 60% NAC został zmieszany z OVA (10 mg/ml) celem otrzymania formułki zawierającej 2 mg/ml OVA w 10% NAC. Formułki zostały następnie rozcieńczone do 0,1 % NAC z użyciem 1 mM HEPES o pH 7, a następnie rozdzielono NAC i niezwiązane z nim białko z użyciem filtra, którego pory miały wielkość 100 nm (nr kat. UFC 30VV25, Merck Millipore). Formułki zwirowano 12000 x g przez 5 minut (Minispin Centrifuge, Eppendorf®, Hamburg, Niemcy). Oznaczono zawartość białka w supernatancie z użyciem zestawu do oznaczania niskich stężeń białek Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Filtrację przeprowadzono po 30 minutach od rozpoczęcia eksperymentu, po 4 godzinach i po 24 godzinach. Wyniki zaprezentowano jako “efektywność zamykania białka” co oznacza procentową zawartość wolnego białka w supernatancie w odniesieniu do ilości całkowitego użytego białka.

6.2.7. Wpływ nanoadiuwantu na owoalbuminę

Zbadano wpływ nanoadiuwantu na integralność białka. Przygotowano próbki zawierające 1 mg/ml OVA w 10% NAC. Te próbki przechowywano do sześciu miesięcy w 4 °C i w temperaturze pokojowej. Próbki formulacji pobrano w momencie rozpoczęcia eksperymentu „0”, po dwóch miesiącach i po sześciu miesiącach przechowywania. Integralność białka badano z użyciem metody SDS-PAGE [229]. Nałożono równe ilości białka na ścieżki 12,5% żelu poliakrylamidowego (2,5 µg OVA w NAC lub samo OVA). Białka rozdzielano w buforze Tris-glicyna-SDS przez 1,5 godziny w 100 V (Mini-Protean Tetra Cell 165-8001, Bio-Rad). Żele zwizualizowano z użyciem Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) i udokumentowano z użyciem systemu GelDoc.

6.2.8. Sterylizacja NAC

Badane NAC poddano sterylizacji w autoklawie 2540 ML (Tuttnauer, Nowy Jork, USA). 250 µl 60% NAC umieszczono w szklanych pojemnikach zamykanych korkiem (LLG-4008248, LLG) i poddano standardowemu programowi sterylizacji (121 °C, 30 min). Zbadano wielkość cząstek i ich potencjał zeta przed i po procesie autoklawowania.

6.2.9. Wpływ obecności soli i fizjologicznego pH na stabilność NAC

Według danych literaturowych śluz wyściełający jamę nosową zawiera około 1% soli [252]. Zakładając, że tą solą jest NaCl odpowiada to jej stężeniu molowym równym 0,17 M. Zbadano wpływ obecności soli, w zakresie od 0 do 0,5 M NaCl na wielkość kropeł NAC. Zbadano również wpływ pH, w zakresie występującym w jamie nosowej czyli od 5,7 do 8,2 [253], na wielkość kropeł NAC. Oznaczenie ZP nanoadiuwantu w obu eksperymentach było niemożliwe ze względu na obecność jonów soli, które zakłócały pomiar. Dane poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 8.0, użyto testu Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

6.2.10. Linie komórkowe i ich hodowla

Linia komórkowa JAWSII (ATCC[®] CRL-11904[™]) została pierwotnie wyizolowana ze szpiku myszy C57BL/6. Są to niedojrzałe komórki dendrytyczne. Komórki linii JAWSII hodowano w medium alpha-MEM (Gibco) z rybonukleozydami oraz dezoksyrybonukleozydami, dodatkiem 4 mM L-glutaminy, 1 mM pirogronianu

sodu, 5 ng/ml GM-CSF (Thermo Fisher Scientific) i 10% surowicy bydlęcej. Komórki przesiewano w stosunku 1:2, z częstotliwością raz na siedem dni. Hodowle prowadzono w inkubatorze w warunkach temperatury równej 37 °C oraz 5% CO₂.

Linia komórkowa TC-1 (ATCC® CRL-2785™) została pierwotnie wyizolowana z nowotworu płuc myszy C57BL/6. Są to komórki typu nabłonkowego. Komórki linii hodowano w medium DMEM (Gibco) z 10% surowicą bydlęcą. Komórki przesiewano w stosunku 1:4, z częstotliwością co trzy dni. Hodowle prowadzono w inkubatorze w warunkach temperatury równej 37 °C oraz 5% CO₂.

Linia komórkowa FaDu (ATCC® HTB-43™) została pierwotnie wyizolowana z ludzkiego nowotworu gardła. Są to komórki typu nabłonkowego. Komórki linii hodowano w medium EMEM (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Komórki przesiewano w stosunku 1:3, z częstotliwością co trzy dni. Hodowle prowadzono w inkubatorze w warunkach temperatury równej 37 °C oraz 5% CO₂.

Linia komórkowa RPMI 2650 (ATCC® CCL-30™) została pierwotnie wyizolowana z nowotworu przegrody nosowej człowieka. Są to komórki typu nabłonkowego. Komórki linii hodowano w medium A-MEM (Gibco) z dodatkiem 2,5% surowicy bydlęcej. Komórki przesiewano w stosunku 1:3, z częstotliwością co trzy dni. Hodowle prowadzono w inkubatorze w warunkach temperatury równej 37 °C oraz 5% CO₂.

Makrofagi izolowane ze szpiku myszy (BMDM) zostały otrzymane z myszy C57BL/6 [254]. Komórki szpiku kostnego zostały pobrane z kości udowej i piszczelowej myszy w warunkach aseptycznych i były hodowane w 37 °C, 5% CO₂ w medium RPMI (Gibco) z 10% surowicą bydlęcą z dodatkiem 50 ng/ml M-CSF (Peprotech, Londyn, UK). Po 7 dniach inkubacji odrzucono komórki, które nie przywarły do podłoża. Pozostałe komórki zeszkrobano po 20 minutowej inkubacji na lodzie w PBS. Komórki policzono i zamrożono w -80 °C w medium hodowlanym z dodatkiem 10% dimetylosulfotlenku.

6.2.11. Badanie cytotoksyczności nanoadiuwantów

Posiano 2 x 10⁴ komórek na dołek płytki 96-dołkowej, U-kształtnej w 100 µl podłoża pełnego z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej i hodowano przez noc w inkubatorze (37 °C i 5% CO₂). Do komórek dodano 100 µl NAC o stężeniu końcowym od 0,001% do 0,1% i inkubowano komórki przez 24 godziny. Cytotoksyczność NAC zmierzono przy użyciu testu wykorzystującego barwnik sulforodaminę B (test SRB)

[255]. Jest to test kolorymetryczny, w którym oznacza się białko całkowite w żywych komórkach. Do komórek na płytce 96-dołkowej dodano 100 μ l zimnego 20% kwasu trifluorooctowego i inkubowano przez 1 godzinę w 4 °C. Następnie płytkę płukano kilkakrotnie wodą. Po osuszeniu płytki dodano do niej 50 μ l roztworu 0,04% SRB w 1% kwasie octowym, płytkę inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Płytkę przepłukano kilkakrotnie 1% kwasem octowym, aż do wymycia niezwiązanego barwnika. Następnie wywołano test poprzez dodanie 100 μ l 10 mM Tris pH 10,5. Po 30 minutach odczytano wynik z użyciem czytnika płytek SpectraMax (Molecular Devices Corp., San Jose, USA) przy długości fali 610 nm. Kontrolę negatywną stanowiły komórki nietraktowane NAC. Test powtórzono trzykrotnie.

6.2.12. Wpływ nanoadiuwantów na indukcję TNF- α

Posiano 0,1 x 10⁵ komórek BMDM na dołek płytki 96-dołkowej, U-kształtnej w 200 μ l medium pełnego z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej i inkubowano je przez noc. Następnego dnia wymieniono podłoże świeże (180 μ l) i dodano 10 μ l NAC tak, aby końcowo w dołku uzyskać stężenia równe 0,001%, 0,003% i 0,01%. Następnie do dołków dodano 10 μ l LPS z *E. coli* K12 (nr kat. tlr1-peklps, InvivoGen, San Diego, USA) do końcowego stężenia 1 ng/ml. Dodatkowo przygotowano komórki, do których dodano jedynie NAC lub LPS (kontrola negatywna). Komórki stymulowano przez 24 godziny, po czym zebrano supernatanty celem oznaczenia stężenia cytokiny prozapalnej TNF- α . Stężenie cytokiny oznaczono za pomocą zestawu ELISA MAX Mouse TNF- α (BioLegend, San Diego, USA) według zaleceń producenta. Każdy supernatant oznaczono w dwóch powtórzeniach, a sam eksperyment został powtórzony czterokrotnie.

6.2.13. Wpływ nanoadiuwantów na pochłanianie i przekazywanie antygeny

Badane komórki (JAWSII lub TC-1) wysiewano w stężeniu 0,2 x 10⁶ komórek/dołek na płytce 24-dołkowej w 500 μ l medium pełnego z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Po adhezji komórek do dna płytki (po około 4 godzinach) dodawano modelowego antygeny w postaci DQ-OVA (nr kat. D12053, Thermo Fisher Scientific) w stężeniu 10 μ g/ml w medium pełnym z 10% surowicy bydlęcej. DQ-OVA jest substratem dla proteaz, które po enzymatycznym odcięciu owoalbuminy uwalniają fluorescencyjny peptyd (maksimum ekscytacji 505 nm, maksimum emisji 515 nm). Komórki dendrytyczne inkubowano z DQ-OVA z dodatkiem 0,03% NAC lub bez NAC

przez 4 godziny w 37 °C, a komórki nabłonkowe przez 12 godzin w 37 °C. Następnie, komórki zostały przepłukane PBS-em o temperaturze 37 °C celem usunięcia wolnego białka DQ-OVA. Komórki zebrano z użyciem 0,25% trypsyny w PBS. Komórki analizowano z użyciem cytofluorometru FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA). Wykonano również eksperyment kontrolny, w którym inkubacja komórek była prowadzona w 4 °C celem weryfikacji czy badany proces pochłaniania antygeny jest procesem aktywnym, zależnym od metabolizmu komórki. Komórki kontrolne to komórki nietraktowane. Pokazane wyniki są reprezentatywne dla co najmniej dwóch niezależnych eksperymentów.

Zbadano wpływ dodatku NAC na przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami immunokompetentnymi. $0,2 \times 10^6$ komórek TC-1 wysiano na dołki płytki 24-dołkowej w 500 μ l medium pełnego z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz DQ-OVA w stężeniu 10 mg/ml, z lub bez 0,03% NAC, inkubowano przez noc w 37 °C. Następnego dnia medium zebrano, a komórki przepłukano ciepłym PBS celem usunięcia wolnego DQ-OVA i pozostałości NAC. Następnie dodano komórki JAWSII w stosunku 1:1, wybarwione barwnikiem PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling według wskazań producenta (nr kat. PKH26GL, Sigma-Aldrich). Komórki hodowano w kokulturze przez 4 godziny w 37 °C, po czym zebrano wszystkie komórki z płytki za pomocą trypsynizacji. Komórki po przepłukaniu PBSem analizowano z użyciem cytofluorometru FACSCalibur.

Wyniki powyższych eksperymentów poddano analizie statystycznej z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 8.0. Użyto testu 1-way lub 2-way ANOVA ($p < 0,05$).

6.2.14. Badanie toksyczności NAC w eksperymencie *in vivo*

Badano tolerancję NAC z użyciem myszy C57BL/6 (nr zezwolenia LKE 005/2019/P1). Myszy ($n = 40$) utrzymywane były w Zwierzętarni Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Zwierzęta znajdowały się w klatkach po 5 myszy w standardowych warunkach. Myszy miały stały dostęp do pokarmu i wody. Wszystkie pomieszczenia spełniały warunki SPF (z ang. *Specific Pathogen Free*). Zwierzęta były kontrolowane co najmniej raz dziennie przez przeszkolonego opiekuna. NAC podawano donosowo oraz domięśniowo w maksymalnych dawkach 20% (donosowo) i 2,5% (domięśniowo) (**Tabela 8**). Myszy zważono przed i siedem dni po podaniu NAC. Przez cały okres trwania eksperymentu obserwowano myszy pod kątem odczuwanego dystresu

(zmiana zachowania, stroszenie sierści, opuchlizna w miejscu podania szczepionki). Po zakończeniu eksperymentu myszy zostały uśmiercone poprzez przerwanie rdzenia kręgowego.

Tabela 8 Opis grup myszy użytych w eksperymencie badającym toksyczność NAC in vivo.

Nr grupy	Skład szczepionki	Droga podania	Stężenie NAC	Liczba myszy
1	NAC3	donosowo	20%	5
2	NAC7	donosowo	20%	5
3	NAC13	donosowo	20%	5
4	PBS	donosowo	0%	5
5	NAC3	domięśniowo	2,5%	5
6	NAC7	domięśniowo	2,5%	5
7	NAC13	domięśniowo	2,5%	5
8	PBS	domięśniowo	0%	5

6.3. Badanie właściwości immunogennych protoszczepionek

Badane protoszczepionki składają się z jednego z trzech nanoadiuwantów (NAC3, NAC7 lub NAC13). Modelowym antygenem były koniugaty epitopów białka Cwp22 otrzymane w toku niniejszej pracy oraz jeden koniugat epitopu białka M24 bakterii CD otrzymany przez Katarzynę Pacygę w ramach pracy magisterskiej zrealizowanej w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej. Koniugaty składają się z epitopu oraz białka nośnikowego KLH: K1 (ATGKKGSETPTGKTKVC-KLH), K2 (VNKIKNRPYYKGNIPGC-KLH) i K3 (KKGIKC-KLH).

Myszy

Badano immunogenność protoszczepionki składającej się z zestawu koniugatów (K1, K2, K3) i NAC (NAC 3, 7 lub 13) z użyciem konwencjonalnej myszy C57BL/6 (nr zezwolenia LKE 043/2019). Myszy utrzymywane były w Zwierzętarńi Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Zwierzęta znajdowały się w klatkach po 5 myszy w standardowych warunkach. Myszy miały stały dostęp do pokarmu i wody. Wszystkie pomieszczenia spełniały warunki standardu SPF.

Przebieg doświadczenia

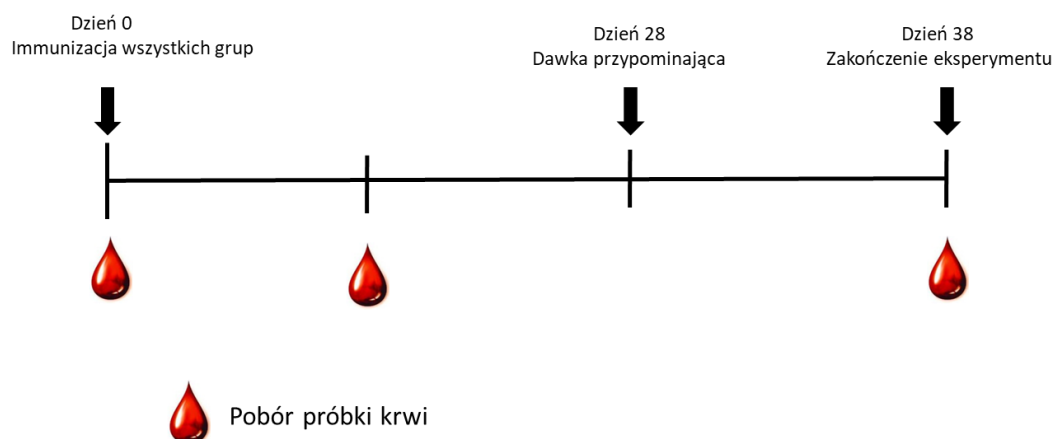
Poszczególne grupy badawcze charakteryzuje **Tabela 9**. Myszy były ważone na początku i na końcu eksperymentu. Szczepionka została przygotowana przez proste zmieszanie zawiesiny koniugatów i NAC (NAC3, 7 lub 13). W każdej protoszczepionce znajduje się po 7 µg każdego z koniugatów na mysz. Myszy z grup, którym aplikowano szczepionkę donosowo (grupy 1 - 4) zostały uprzednio uśpione poprzez inhalację 3% izofluranem. Szczepienie donosowe odbywało się z użyciem końcówki pipety, aplikowano 20 µl protoszczepionki (po 10µl/nozdrze). Mysiom, którym podawano szczepionkę domięśniowo (grupy 5 – 8) aplikowano 100 µl protoszczepionki w mięsień czterogłowy prawej nogi za pomocą iniekcji (igła G27 x ½”). Zastosowane stężenie alum wynosiło 0,5 mg/ml.

Tabela 9 Opis badanych grup w doświadczeniu określającym wpływ protoszczepionki na indukcję przeciwciał.

Numer grupy	Opis grupy	Stężenie NAC	Droga podania
1	NAC3 + K1, K2, K3	10%	donosowo
2	NAC13 + K1, K2, K3	10%	donosowo
3	NAC7 + K1, K2, K3	10%	donosowo
4	PBS	0%	donosowo
5	NAC3 + K1, K2, K3	2,5%	domięśniowo
6	NAC13 + K1, K2, K3	2,5%	domięśniowo
7	alum + K1, K2, K3	0%	domięśniowo
8	PBS	0%	domięśniowo

K – koniugat.

Myszy szczepiono dwukrotnie według schematu na **Rysunku 5**. Krew (0,1 ml) pobierano z żyły jarzmowej. Początkowo okolica jarzmowa każdej myszy została wygolona. Krew była pobierana poprzez nakłucie igłą żyły jarzmowej i jej swobodny wypływ do sterylnej probówki. Krwawienie zatrzymano przez koagulację naturalną. Eksperyment zakończono w dniu 38. Pobrano śledziony myszy wszystkich grup oraz krew celem otrzymania surowicy.



Rysunek 5 Schemat szczepienia myszy. Myszy zostały zaszczepione dwukrotnie, w dniu 0 oraz po czterech tygodniach. Próbkę krwi pobierano w dniu 0, po 14 dniach i po zakończeniu eksperymentu w dniu 38.

Stosunek wagi śledziony do wagi myszy

Pobrano śledziony od myszy wszystkich grup celem obliczenia parametru masa śledziony/masa myszy.

Oznaczenie przeciwciał

Przygotowano surowicę z zebranej krwi myszy. Inkubowano krew przez 30 min w 37 °C, a następnie umieszczono na noc w 4 °C. Zebrano otrzymaną surowicę i zwirowano przy 5 000 x g, przez 30 min. Surowicę pozbawioną czerwonych krwinek, podzielono na mniejsze porcje i zamrożono w -20 °C.

W zebranej surowicy oznaczono zawartość całkowitych przeciwciał IgG oraz IgA z użyciem komercyjnych zestawów firmy Bethyl Laboratories (Montgomery, USA). Oznaczono również zawartość przeciwciał specyficznych IgG i IgA względem koniugatów zawartych w protoszczepionce. Opłaszczono płytkę 96-dołkową K1, K2, K3 lub KLH w stężeniu 4 µg/ml w 0,05 M buforze węglanowym o pH 8,3. Płytkę inkubowano przez noc w 4 °C. Następnego dnia płytkę płukano trzykrotnie PBS-T, a następnie blokowano roztworem 1% BSA w PBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Płytkę trzykrotnie przepłukano i dodano roztwory surowic w PBS-T odpowiednich grup. Inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Płytkę trzykrotnie przepłukano PBS-T. Na dołki płytki nałożono roztwór PBS-T przeciwciał anty-mysich IgG lub IgA skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (w rozcieńczeniu 1:10000) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Reakcję barwną

wywołano poprzez dodanie substratu w postaci AP Yellow i inkubowano przez 30 min. Odczytano absorbancję przy 450 nm z użyciem czytnika płytek SpectraMax.

Analiza statystyczna

Dane otrzymane w trakcie eksperymentów były analizowane z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 8.0. Użyto następujących testów statystycznych 1-way, 2-way ANOVA, test t.

7. Wyniki

7.1. Badania nad nowymi epitopami CD

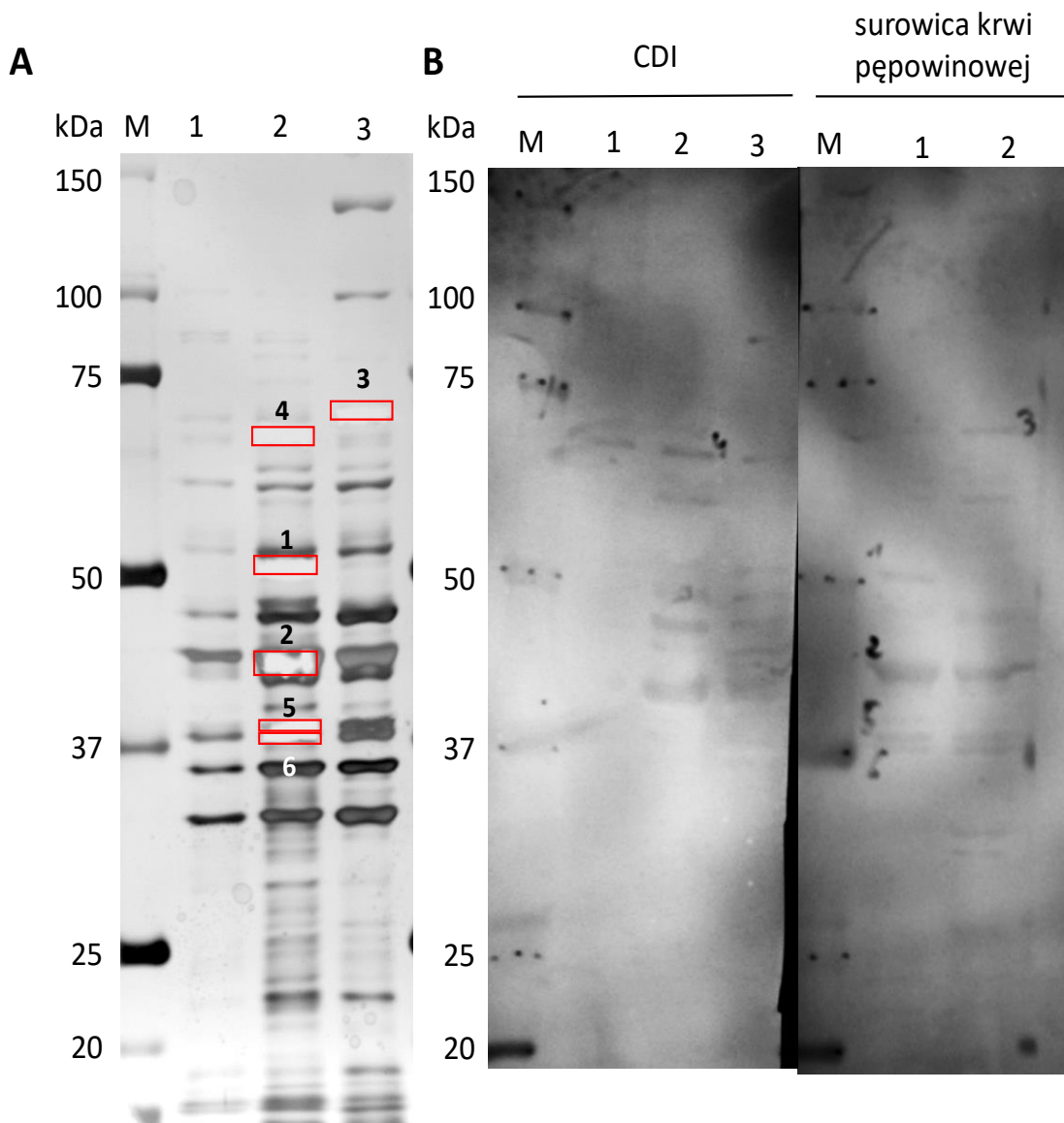
Badania dotyczące identyfikacji nowych epitopów *Clostridioides difficile* miały na celu określenie nieopisanych jak dotąd potencjalnych antygenów szczepionkowych. Badania prowadzono z użyciem szczepów klinicznych oraz surowic krwi trzech grup: pacjenci z CDI, zdrowi ochotnicy i surowica otrzymana ze sznura pępowinowego.

7.1.1. Identyfikacja białka Cwp22 jako białka immunoreaktywnego

Szczepy kliniczne (CD20 i CD27) zostały otrzymane w ramach współpracy z prof. dr hab. Gayane Martirosian ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Izolacja białek powierzchniowych z użyciem 1 M LiCl przeprowadzona na 0,1 g masy bakteryjnej pozwoliła na uzyskanie około 150 µg mieszaniny białek powierzchniowych. Białka powierzchniowe wyizolowano również ze szczepu kontrolnego R20291 zakupionego w niemieckiej bazie DSMZ (www.dsmz.de). Izolaty białek powierzchniowych wszystkich trzech szczepów CD rozdzielono z użyciem elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Zastosowano żel poliakrylamidowy o niestandardowej długości 12 cm celem zwiększenia stopnia rozdzielania białek. Wszystkie próbki białek powierzchniowych zostały naniesione na żel w trzech powtórzeniach. Po rozdziale elektroforetycznym żel został podzielony na trzy części z czego jedna została wybarwiona metodą srebrową (**Rysunek 6A**), a dwie pozostałe poddano Western blottingowi (**Rysunek 6B**). W analizie Western blot użyto surowicy krwi obwodowej uzyskanej od pacjentki z CDI (nr 3, **Tabela 4**) lub surowicę krwi pępowinowej (nr 7, **Tabela 5**).

Profil elektroforetyczny otrzymany dla wyizolowanych białek powierzchniowych CD jest spójny z danymi dotychczas opublikowanymi (**Rysunek 6A**) [207]. Na wysokości równej masie cząsteczkowej 32,5 kDa znajdują się białka warstwy S o niskiej masie cząsteczkowej (LMW), a na wysokości równej masie cząsteczkowej 47,5 kDa białka warstwy S o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW). Profil wyizolowanych białek powierzchniowych jest wzbogacony w prążki w przypadku szczepów klinicznych, zarówno w zakresie białek o niskich jak i wysokich masach cząsteczkowych. Badanie immunoreaktywności wyizolowanych białek za pomocą Western blot wykazało zróżnicowanie pomiędzy oboma badanymi szczepami klinicznymi (CD20 i CD27). Wyizolowano znacznie więcej białek immunoreaktywnych ze szczepu CD27. Co ciekawe, więcej immunoreaktywnych białek zostało wykrytych z użyciem surowicy krwi pępowinowej niż w przypadku surowicy pacjenta z ostrym przebiegiem choroby. W przypadku próbki białek wyizolowanych ze szczepu kontrolnego, jedynie kilka białek wykazywało immunoreaktywność z badanymi surowicami.

Po porównaniu wyników otrzymanych dla obu surowic zdecydowano o wycięciu prążków z żelu, dla których potwierdzono immunoreaktywność z obiema badanymi surowicami. Wycięto z żelu 6 prążków (zaznaczone na **Rysunku 6A**). Prążki zostały przesłane do Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk celem identyfikacji. Wyniki identyfikacji przedstawia **Tabela 10**.



Rysunek 6 Analiza immunoreaktywności białek CD. Rys. 6A przedstawia wynik rozdzielania elektroforetycznego białek powierzchniowych CD izolowanych metodą z użyciem 1 M LiCl (stan żelu po wycięciu białek do identyfikacji); żel barwiono metodą srebrową; czerwone ramki zawierają prążki wycięte do identyfikacji. Oznaczenie ścieżek: M – marker mas cząsteczkowych białka, 1 – szczep kontrolny R20291, 2 – szczep kliniczny CD20, 3 – szczep kliniczny CD27. Rys. 6B przedstawia wynik Western blot przeprowadzonego z dwoma surowicami (pacjent z CDI i surowica krwi pępowinowej). Oznaczenie ścieżek: M – marker mas cząsteczkowych białka, 1 – szczep kontrolny R20291, 2 – szczep kliniczny CD20, 3 – szczep kliniczny CD27. Brak ścieżki ze szczepem kontrolnym w przypadku membrany inkubowanej z surowicą krwi pępowinowej.

Uzyskane wyniki identyfikacji były dobrej jakości, o czym świadczy wysoki stopień pokrycia sekwencji i identyfikacja peptydów unikalnych dla danego białka (**Tabela 10**). Masy cząsteczkowe otrzymane dla zidentyfikowanych białek odpowiadają ich umiejscowieniu na żelu poliakrylamidowym (**Rysunek 6A**). Przyjęto, że identyfikację można uznać za wiarygodną, gdy wśród zidentyfikowanych peptydów są, co najmniej, dwa peptydy unikalne dla danego białka [256]. Co najmniej dwa unikalne peptydy uzyskano dla syntazy glutaminowej NADPH-zależnej i oksydoreduktazy NAD(P)/FAD-zależnej zidentyfikowanych w prążku nr 1; transferazy CoA zidentyfikowanej jako jedno z białek w prążku 2; peptydazy M24 i białka Cwp2 zidentyfikowanych jako jedno z białek w prążku nr 3; białka Cwp22 zidentyfikowanego w prążku nr 4; aminotransferazy alanino-glioksylanowej i racemazy prolinowej zidentyfikowanych w prążku nr 5; dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego zidentyfikowanej w prążku nr 6. Z dalszych analiz wyłączono białka, dla których nie zidentyfikowanego żadnego unikalnego peptydu, czyli acetylotransferazę acetylo-CoA (zidentyfikowana jako jedno z dwóch białek w prążku nr 2) i kinazę pirogronianową (zidentyfikowana jako jedno z trzech białek w prążku nr 3).

Zidentyfikowane immunoreaktywne białka, spośród wszystkich wyizolowanych białek powierzchniowych CD, to głównie białka biorące udział w szlakach metabolicznych. Do izolacji immunoreaktywnych białek użyto metody przeznaczonej do izolacji białek powierzchniowych, co jednak nie wyklucza obecności w preparacie białek o innej lokalizacji. Niektóre z białek zebranych w **Tabeli 10** zostały opisane u innych szczepów bakteryjnych jako tzw. „moonlighting proteins” czyli białka o dodatkowej funkcji, która może być pełniona w innej lokalizacji niż ta typowa dla tego białka [257].

Tabela 10 Wynik identyfikacji immunoreaktywnych białek CD.

Nr prążka	Identyfikator białka (baza NCBI)	Nazwa białka	Masa [kDa]	Pokrycie sekwencji aminokwasowej	Zidentyfikowane peptydy	Unikalne peptydy
1	WP_009893107	syntaza glutaminowa NADPH-zależna	50,28	65%	75	7
	WP_009891315	oksydoreduktaza NAD(P)/FAD-zależna	51,31	67%	66	3
2	WP_009888868	acetylotransferaza acetylo-CoA	41,01	86%	171	0
	WP_003427766	transferaza CoA	44,5	87%	160	28
3	WP_003436250	kinaza pirogronianowa	63,47	58%	81	0
	WP_009893549	peptydaza M24	68,5	72%	107	13
	WP_009891054	Cwp2	66,43	62%	47	15
4	WP_009890957	Cwp22	71,03	60%	57	15
5	WP_009890731	aminotransferaza alanino-glioksydanowa	42,74	75%	92	56
	WP_003422090	racemaza prolinowa	36,43	66%	82	82
6	WP_003421962	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	36,24	77%	183	16

Przeprowadzono bioinformatyczną analizę możliwości użycia nowo zidentyfikowanych immunoreaktywnych białek jako antygenów w potencjalnych szczepionkach. Pod uwagę wzięto dane literaturowe oraz informacje z dostępnych baz danych. W programie Clustal Omega porównano sekwencje zidentyfikowanych białek z sekwencjami tych samych białek lub białek homologicznych, istotnych klinicznie szczepów CD, innych patogenów, bakterii tworzących naturalną mikroflorę jelitową człowieka oraz białek własnych człowieka (dane nie zawarte w tej pracy). Analizę przeprowadzono celem uniknięcia reaktywności krzyżowej białek CD z białkami o wysokiej homologii produkowanych przez szczepy własnej mikroflory. W wyniku powyższej analizy, odrzucono białka zidentyfikowane w prążkach nr 1, 2 i 5 ze względu na zbyt duże rozpowszechnienie sekwencji aminokwasowej. Z białek zidentyfikowanych w prążku nr 3 wybrano do dalszych analiz białko, dla którego zidentyfikowano większą liczbę unikalnych peptydów, to jest peptydazę M24. Poszukiwanie epitopów peptydazy M24 było przedmiotem pracy magisterskiej pani Katarzyny Pacygi, a wyniki otrzymane w trakcie realizacji tej pracy magisterskiej są w trakcie publikacji. Jeden z uzyskanych

przez panią Katarzynę Pacygę epitopów peptydazy M24 został wykorzystany w niniejszej pracy w badaniach *in vivo*. Analiza bioinformatyczna, w tym określenie epitopów białka zidentyfikowanego w prążku nr 4 jako Cwp22 i możliwość jego użycia w protoszczepionce, jest przedmiotem niniejszej rozprawy. Interesujące dane otrzymane dla dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego z prążka nr 6 zostały przez nas opublikowane w osobnej pracy [258].

7.1.2. Analiza bioinformatyczna białka Cwp22

Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej białka Cwp22 obejmowała określenie zmienności sekwencji aminokwasowej białka pomiędzy szczepami CD (program BLAST) oraz innymi szczepami bakteryjnymi zarówno patogennymi jak i zasiedlającymi zdrowy układ pokarmowy (Clustal Omega). Ustalono prawdopodobną strukturę drugorzędową białka (używając programu Predict Protein) oraz zidentyfikowano domeny konserwatywne (używając programu BLAST).

Z dostępnych danych literaturowych wynika, że gen *cwp22* jest obecny u wielu szczepów CD i jest on silnie konserwatywny [259]. Przeprowadzono analizę zmienności sekwencji aminokwasowej białka Cwp22 wśród różnych szczepów CD (**Tabela 11**). Analiza ta miała na celu określenie, czy białko jest konserwatywne wśród szczepów *Clostridioides* i czy może być dobrym kandydatem szczepionkowym. Analiza z użyciem wszystkich 92 sekwencji białka Cwp22 obecnych w bazie NCBI wykazała, że sekwencja aminokwasowa białka Cwp22 (WP_009890957) jest bardzo konserwatywna wśród różnych szczepów *Clostridioides*. Na liście szczepów znajdują się zarówno szczepy kliniczne jak i referencyjne, o różnym profilu produkowanych toksyn, izolowane od dorosłych i dzieci. Dla wszystkich zbadanych sekwencji podobieństwo sekwencji aminokwasowej do sekwencji WP_009890957 wynosiło co najmniej 91%, co oznacza dużą konserwatywność sekwencji aminokwasowej białka wśród badanych szczepów. W **Tabeli 11** znajdują się wyłącznie wyniki, dla których możliwe było ustalenie dokładnego szczepu CD. Niestety, nie dla każdego szczepu możliwe było ustalenie profilu produkowanych toksyn, rybotypu czy też źródła izolacji (brak takich danych w bazie NCBI).

Tabela 11 Wynik analizy zmienności sekwencji białka Cwp22 pomiędzy szczepami CD, uzyskany w oparciu o dane z serwera BLAST oraz NCBI

Identyfikator białka	Szczep CD	Informacje	Pokrycie sekwencji WP_009890957.1	% identycznych aminokwasów
CBA64897.1	CD196	wyizolowany od osoby dorosłej, rybotyp 027, A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	100%	99,84%
PBF93815.1	7468-NonSp/ST97	wyizolowany od dziecka, A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	100%	99,69%
EQG56151.1	DA00145	toksynotwórczy	100%	99,69%
EQH98359.1	F314	toksynotwórczy, izolowany z ostrego przypadku CDI	100%	99,69%
OFU21376.1	HMSC19C09		100%	99,69%
OFU05949.1	HMSC19D07		100%	99,53%
EHI35368.1	70-100-2010		100%	99,38%
PBG98735.1	7481-NonSp/ST59		100%	99,22%
EQF50178.1	CD174	nie produkuje toksyn, nosiciel bezobjawowy	100%	99,07%
EQE30253.1	CD34	nie produkuje toksyn, nosiciel bezobjawowy	100%	99,22%
AFV69537.1	C192	rybotyp 012, hiperwirulentny, wielolekooporny	100%	99,22%
EQJ05755.1	P7	szczep referencyjny, toksynotwórczy	100%	99,07%
PBE99335.1	5573-CF/ST37	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	100%	98,76%
EQE84199.1	CD69	toksynotwórczy, izolowany z ostrego przypadku CDI	100%	98,91%
OJT75205.1	NT422	rybotyp 231	98%	99,37%
EFH06251.1	NAP08	hiperwirulentny	100%	96,89%
PBI20744	6615-NonSp/ST11	izolowany od dziecka, hiperwirulentny	100%	96,74%
KPI50551	RA09-70	A ⁺ B ⁻	100%	93,17%
PBE36357.1	5537-D/ST9	izolowany od dziecka, A ⁺ B ⁺	100%	91,93%
ERM37167	P64	nosiciel bezobjawowy, szczep toksynotwórczy	79%	99,41%
EQE47488	CD42	toksynotwórczy, izolowany z ostrego przypadku CDI	73%	99,3%
EQK74493	CD113	nawrót choroby, toksynotwórczy	72%	99,51%

Przeprowadzono porównanie sekwencji aminokwasowej białka Cwp22 z białkami homologicznymi innych gatunków bakterii, w tym bakterii składających się na mikroflorę jelitową człowieka. Ma to na celu ustalenie ewentualnej reaktywności krzyżowej między szczepami bakteryjnymi. W przypadku krzyżowej reaktywności bakterii mikroflory jelitowej z białkiem Cwp22 dyskwalifikowałaby to białko z użycia w szczepionce. Analiza podobieństwa białka Cwp22 do jego homologów przeprowadzona w programie BLAST wykazała podobieństwo na poziomie około 50% identycznych aminokwasów (**Tabela 12**), głównie w N-końcowej części białka (dane nie zamieszczone w tej pracy). Białka homologiczne do białka Cwp22 to głównie L,D-transpeptydazy bakterii blisko spokrewnionych z bakteriami rodzaju *Clostridioides*, co nie wyklucza użycia białka Cwp22 w szczepionce.

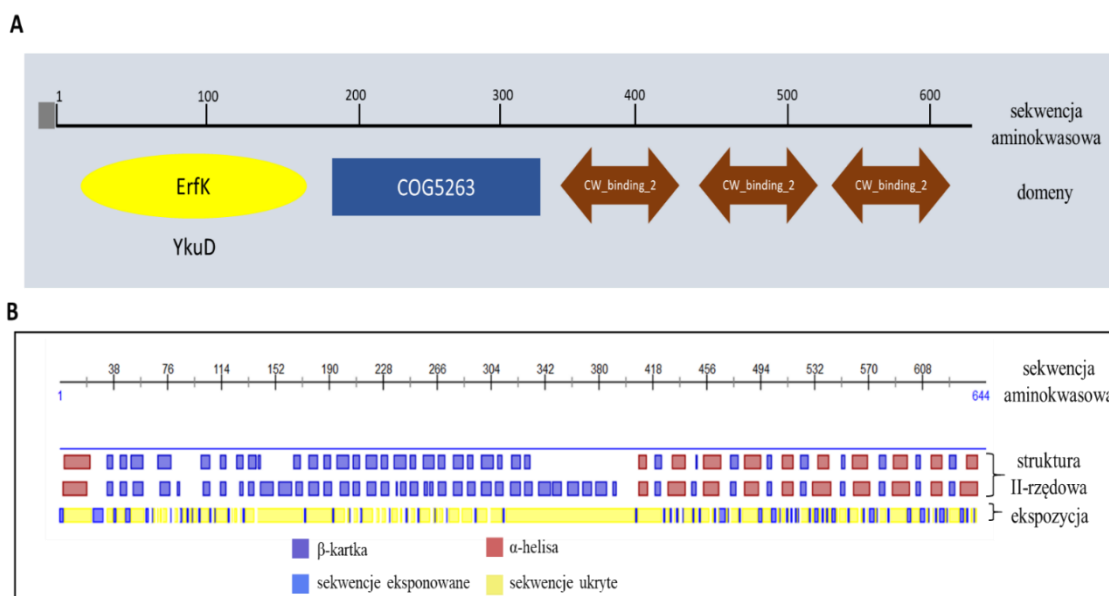
Tabela 12 Wynik analizy białek homologicznych dla białka Cwp22 w oparciu o dane uzyskane z serwera BLAST i NCBI.

Identyfikator białka	Nazwa białka	Nazwa bakterii	Pokrycie sekwencji WP_009890957.1	% identycznych aminokwasów
WP_092726434.1	L,D-transpeptydaza	<i>Romboutsia lituseburensis</i>	53%	56,07%
WP_007287442.1	L,D-transpeptydaza	<i>Clostridium bartletti</i>	53%	51,59%
WP_084157842.1	białko hipotetyczne	<i>Bacillus manliponensis</i>	58%	47,59%
WP_082007829.1	białko hipotetyczne	<i>Terrisporobacter othiniensis</i>	54%	52,1%
WP_052404759.1	L,D-transpeptydaza	<i>Bacillus rubiinfantis</i>	55%	48,66%
WP_066389794.1	L,D-transpeptydaza	<i>Bacillus mesonae</i>	52%	41,9%
KLR55379.1	białko powierzchniowe	<i>Clostridium sordelli</i>	53%	45,98%

Na podstawie sekwencji aminokwasowej określono strukturę II-rzędową oraz zbadano obecność domen konserwatywnych w białku Cwp22 z użyciem serwera BLAST (**Rysunek 7**). Identyfikacja konserwatywnych domen białka pozwala na oznaczenie miejsc funkcyjnych w białku, których ewentualne zablokowanie mogłoby przyczyniać się do zwalczania bakterii. Analiza konserwatywnych domen białka Cwp22 wykazała obecność domeny o aktywności L,D-transpeptydazy (YkuD, należąca do superrodziny ErfK) w N-końcowej części białka. Domena ta może brać udział w budowie i przebudowie peptydoglikanu bakterii [191] (**Rysunek 7A**). L,D-transpeptydazy pełnią podobną rolę do D,D-transpeptydaz, czyli uczestniczą w sieciowaniu peptydoglikanu. W przypadku L,D-transpeptydaz otrzymuje się jednak sieciowanie o odmiennej stereochemii, które może nadawać bakterii oporność na antybiotyki betalaktamowe [260]. W C-końcowej części białka znajdują się 3 domeny wiążące ścianę komórkową (CW_binding_2). Sekwencję białka poprzedza sekwencja sygnałowa, która kieruje transportem białka na zewnątrz komórki.

Stworzenie dobrej jakości modelu przestrzennego białka nie było możliwe ze względu na brak skryzalizowanych białek homologicznych, na których można by oprzeć taki model. W dalszych analizach opierano się o model matematyczny (**Rysunek 7B**)

i narzędzie bioinformatyczne PredictProtein. Analiza wykazała obecność licznych α -helis w C-końcowej części białka, która stanowi region kotwiczący do błony bakteryjnej. Część funkcyjna białka to głównie β -kartki oraz pętle.



Rysunek 7 Analiza domen i struktury II-rzędowej białka Cwp22. Rys. 7A pokazuje wynik analizy domen konserwatywnych białka Cwp22 przeprowadzonej z użyciem programu BLAST. Rys. 7B obrazuje prawdopodobną strukturę II-rzędową białka Cwp22, analiza przeprowadzona z użyciem serwera PredictProtein.

Wszystkie informacje uzyskane powyżej, czyli określenie miejsc funkcyjnych, wolnych pętli i struktury II-rzędowej białka Cwp22 posłużyły w kolejnym punkcie do zaprojektowania peptydów mogących zawierać epitopy rozpoznawane przez przeciwciała zawarte w krwi pacjentów.

7.1.3. Przewidywanie epitopów białka Cwp22

Wykorzystując narzędzia bioinformatyczne wytypowano sekwencje peptydowe, które mogą być rozpoznawane przez limfocyty T i B. Użyto dwóch programów do przewidywania epitopów dla limfocytów B (BCPred oraz BEPIPred) i jeden program do przewidywania epitopów limfocytów T, TepiTool (**Tabela 13**). Wyniki analizy potencjalnych epitopów dla limfocytów B otrzymane z użyciem dwóch różnych programów są komplementarne. Epitopy dla limfocytów T zaproponowane przez program TepiTool są zupełnie inne od tych przewidzianych dla limfocytów B. Bazując na zaproponowanych przez programy sekwencjach epitopów, modelowanej

bioinformatycznie strukturze II-rzędowej, obecności wolnych pętli oraz obecności domen funkcjonalnych zaplanowano syntezę 16-aminokwasowych peptydów (**Rysunek 8**).

Tabela 13 Wynik przewidywania epitopów dla limfocytów B i T. Tab. 13A zawiera sekwencje wytypowane przez program BEPIPred (serwer IEDB) jako potencjalnie zawierające epitopy dla limfocytów B. Tab. 13B zawiera sekwencje wytypowane przez program BCPred jako potencjalnie zawierające epitopy dla limfocytów B. Tab. 13C zawiera sekwencje wytypowane przez program TepiTool (serwer IEDB) jako potencjalnie zawierające epitopy dla limfocytów T.

A	start	sekwencja
	23	VPESAA
	58	ATGKKGSETPTGKTK
	79	NRPYKGNIPGGSPRNPLGD
	108	TYGDTYGIHGNNNESSIG
	176	TGWKTENGKKYYVKSDGTYQK
	228	YLGTDGARV
	253	GVMQTGWQEKNGKKYYL
	273	GLSVT
	279	WQEIDG
	299	WQQIDG
	307	YYLD
	314	KMLT
	320	QKIDGKDYTFNEDGTINPT
	357	VGNWNADSS
	375	AIADGITATPLASSY
	399	ANLPTETV
	424	NAIS
	435	KTFNTETKRIAGQDRYQT
	460	ELGNREEI
	474	SGNGEADALS
	486	SKAGEEK
	502	GITEE
	525	PSAIN
	539	ITTEDISGNRIYGDSRVDT
	619	KVETPYQIGG

B	start	sekwencja
	109	YGDTYGIHGNNNESSI
	85	GNIPGGSPRNPLGDRW
	427	SSKLEQEIKTTFNTET
	377	ADGITATPLASSYDST
	328	TFNEDGTINPTWDTH
	500	KDGITEESYKWLTERK
	395	LTNTANLPTETVEEMK
	16	VLVFCGVPESAAASK
	351	AKKISSVGNWNADSSD
	299	WQQIDGKSYYLDKDGK

C	HLA I	
	start	sekwencja
	624	YQIGGGVSY
	70	KTKVVNKKIK
	76	KIKNRPYYK
	404	ETVEEMKLL
	436	TFNTETKR

	HLA II	
	start	sekwencja
	627	GGGVSYIVMDKLMDI
	156	DYSNDSYVKIAAKYK
	161	SYVKIAAKYKINLNQ
	594	KLHSPIVLMDNSGLS
	151	SDVIIDYSNDSYVKI

1 MKKSLKKYLVLALTLVLFACGVPESAAASKHVIIIVNSRKNLGYFVNNKLVKEFRVATGKKGSETP
 68 TGKTKVNNKIKRNPYYKGNIPGGSPRNPLGDRVMGLALKGYGDTYGIHGNNNESSGXHISGGCI
 134 RMHNKDVRWLFDDQVPVGSVDVIIDYSNDSYVKIAAKYKINLNCVGWKTENGKKYYVKSDGTYQENS
 199 WLKVNKGKMYVFDASGVMQTGWKAINNKKYYLGTGARGVSGWKVIDGKTYFNSDGVMTGWQE
 262 KNGKKYYLGSDDLSTVGTWQEIDGNKYYFDKTGIMQTGWQQIDOKSYLDKDGKMLTGSQKIDGK
 326 DYTFNEDGTINPTWDTIIGANRFDTAKKISSVGNWNADSSDITVILVNGNAIADGITATPLASSYDSDI
 394 LNTNLANLPTETVEEMKLLAPKTVILIGGENAISKLEQEKTTFNTEKRIAGQDRYQDARIAEELG
 463 NREEIKTAYMVSNGEADALSVAASKAGEEKQPIILVNKDGITEDSYKWLTERKLENAYFIGGPSAIN
 530 DSVIAKMNDITTEDISGNRIYGDSRVDINAKVIEKFGDSDLQAVLVSKSDALVDALSAGPLAVKLLH
 597 SPIVLMDNSGLSLEQQRVFNKKVETPYQIGGVSYIVMDKLMILAK

Rysunek 8 Strategia wyboru 16-aminokwasowych sekwencji użytych do mapowania epitopów białka Cwp22. Czarne elipsy oznaczają sekwencje wyznaczone przez program BEPIPred. Czerwone elipsy oznaczają sekwencje wyznaczone przez program BCPred. Niebieskie litery to sekwencje wyznaczone przez program TepiTool do typowania epitopów dla limfocytów T. Zielonymi znacznikami oznaczono 16-aminokwasowe sekwencje wybrane do syntezy.

Podsumowując, bazując na epitopach wytypowanych bioinformatycznie oraz na otrzymanym modelu białka Cwp22 otrzymano dwadzieścia peptydów, których immunoreaktywność została zbadana w dalszych krokach.

7.1.4. Mapowanie epitopów

Zbadano immunoreaktywność peptydów, które wytypowano w punkcie 7.1.3 (**Rysunek 9A**). Zsyntezowano 16-aminokwasowe peptydy stosując technikę chemicznej syntezy peptydów na polietylenowych bolcach (PEPSCAN). Następnie, przeprowadzono test immunoreaktywności ELISA z użyciem połączonych surowic trzech grup, czyli surowicy pacjentów z CDI, zdrowych ochotników i surowicy krwi pępowinowej. W przypadku każdej z grup stosowano to samo rozcieńczenie przeciwciał, to jest 1:100. Rozcieńczenie to zostało dobrane na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych. Następnie, dodawano przeciwciała anty-ludzkie IgG skoniugowane z alkaliczną

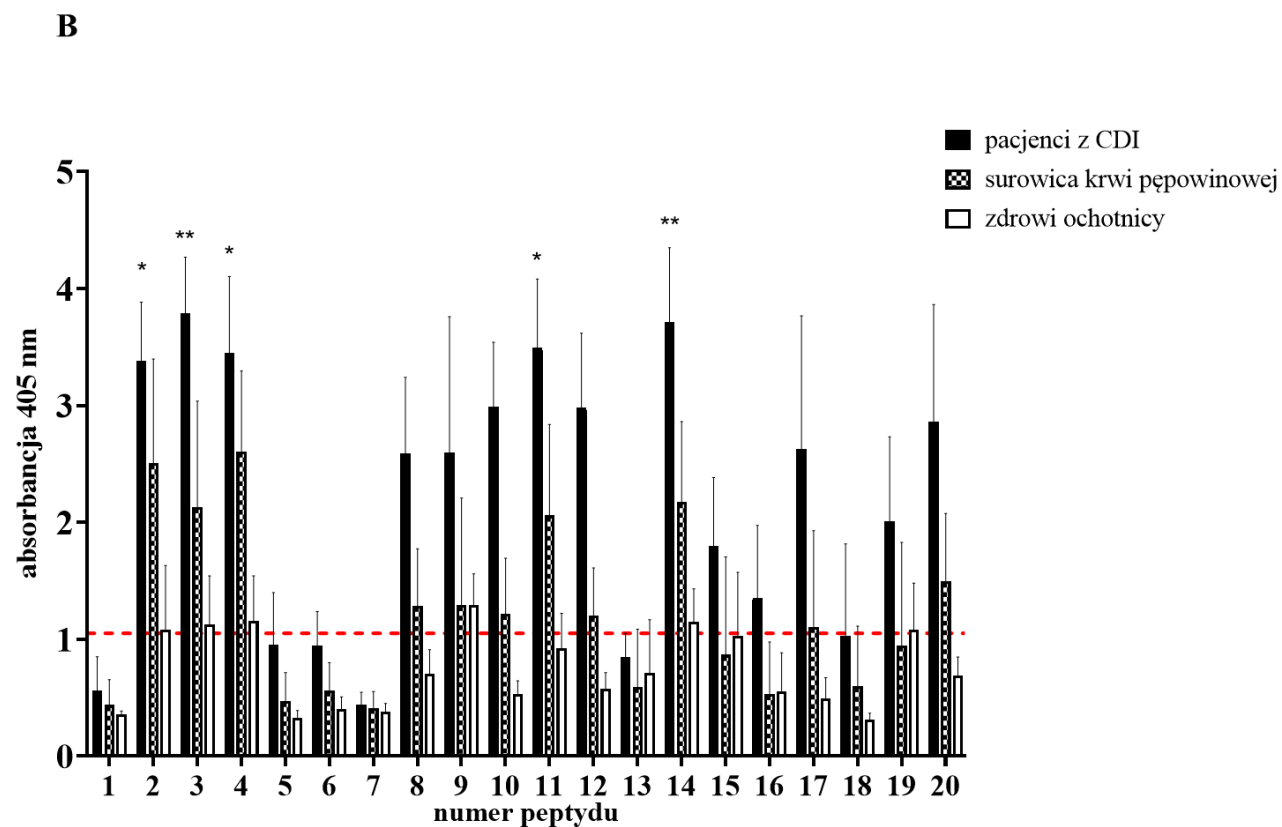
fosfatazą, której poziom aktywności został zmierzony kolorymetrycznie. Poziom immunoreaktywności przeciwciał badanych grup jest wyrażony poziomem absorbancji otrzymanego roztworu (absorbancja przy 405 nm).

Profil immunoreaktywności przeciwciał specyficznych względem zsyntezowanych peptydów jest podobny dla wszystkich trzech grup (**Rysunek 9B**). Wykazano znaczne różnice w poziomach specyficznych względem peptydów przeciwciał we wszystkich badanych grupach. Najwyższy poziom specyficznych przeciwciał oznaczono w grupie surowic pacjentów w trakcie ostrego zakażenia CDI. Interesujące, że na drugim miejscu pod kątem poziomu specyficznych przeciwciał znajduje się grupa surowic krwi pępowinowej. Na trzecim, grupa kontrolna czyli grupa surowic pobranych od osób bez widocznych oznak zakażenia CD, co jednak nie wyklucza nosicielstwa bakterii.

Na podstawie wyników analizy immunoreaktywności uzyskanych peptydów z surowicami pacjentów z CDI wyznaczono sekwencje do dalszego mapowania. Wyliczono wartość poziomu tła (absorbancja 405 nm = 1,05; czerwona linia na **Rysunku 9B**). Na początku odrzucono peptydy 1, 5, 6, 7, 13, 18 jako te o immunoreaktywności niższej od poziomu tła. Następnie, w oparciu o porównanie wartości absorbancji uzyskanych dla pozostałych peptydów z wartością wyliczoną jako poziom tła (absorbancja 405 nm = 1,05), dokonano identyfikacji peptydów o najwyższej immunoreaktywności tj. nr 2, 3, 4, 11 i 14 (ANOVA, $p < 0,05$). Te same peptydy wykazywały również najwyższą immunoreaktywność w przypadku grupy surowic krwi pępowinowej. Peptydy 2, 3, 4, 11 i 14 zostały poddane dalszej analizie celem identyfikacji epitopów.

A

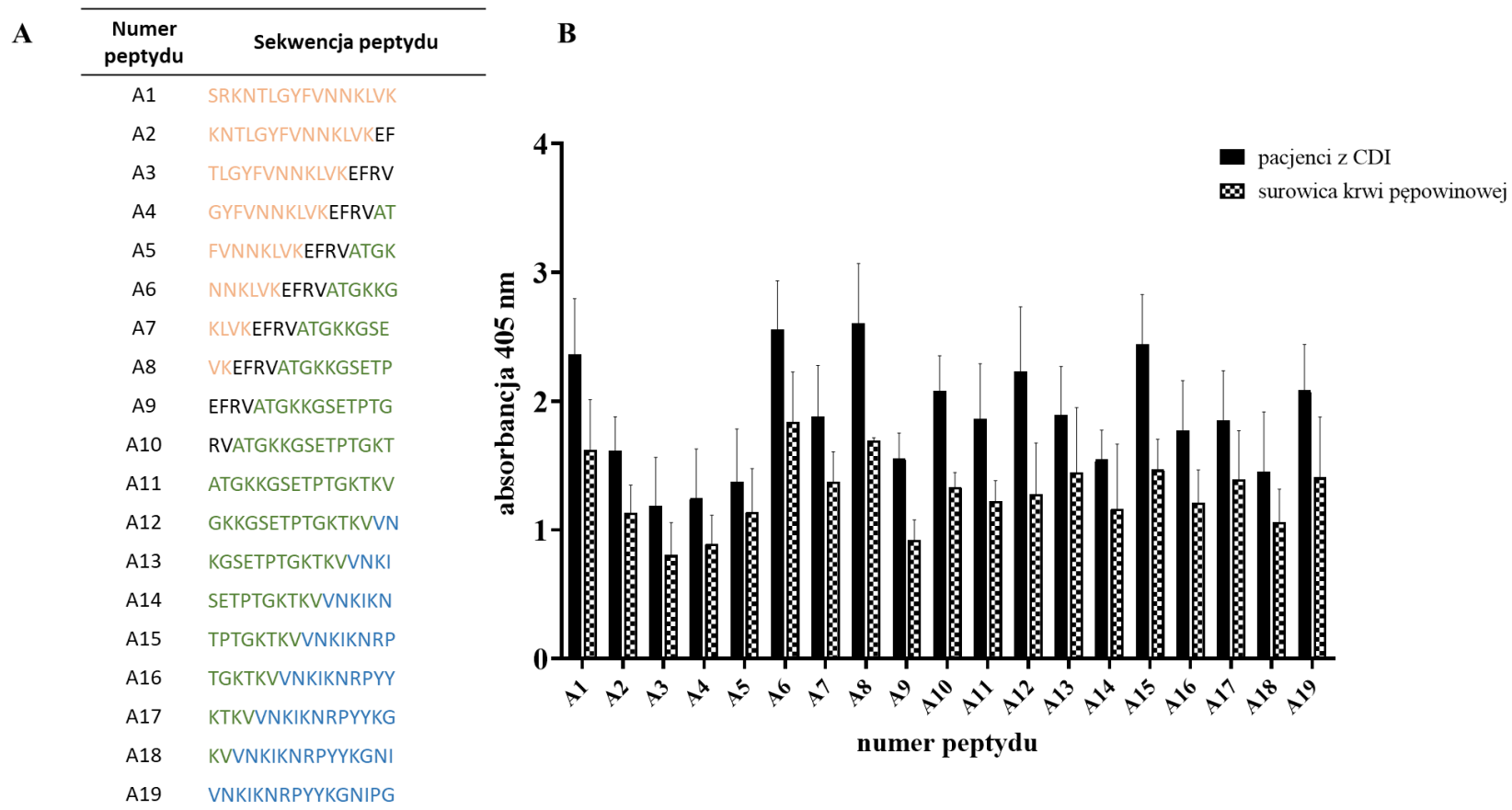
Numer peptydu	Sekwencja peptydu
1	VLVFACGVPESSAASK
2	SRKNTLGYFVNNKLVK
3	ATGKKGSETPTGKTKV
4	VNKIKNRPYKGNIPG
5	YKGNIPGGSPRNPLGD
6	RWMGLALKGTYGDTYG
7	YGIHGNNNESSIGKHI
8	GGCIRMHNKDVRWLF
9	GSDVIIDYSNDSYVKI
10	TGWKTENGKKYYVKSD
11	GTYQKNSWLKVNGKMY
12	NKKYYLGTGDGARVSGW
13	KVIDGKTYFNSDGVM
14	QTGWQEKNKKYYLGS
15	DGLSVTGWQEIDGNKY
16	YFDKTGIMQTGWQQID
17	GKSYLDDKDGKMLTGS
18	DGKMLTGSQKIDGKDY
19	TFNEDGTINPTWDTII
20	FDTAKKISSVGNWNAD



Rysunek 9 Mapowanie białka Cwp22. Rys. 9A Sekwencje zsyntezowanych peptydów. Rys. 9B Immunoreaktywność zsyntezowanych peptydów z badanymi grupami surowic. Immunoreaktywność została zbadana w teście ELISA z użyciem połączonych surowic trzech grup w rozcieńczeniu 1:100. Oznaczenie zostało wykonane co najmniej 4 razy. Czerwona linia oznacza poziom tła. Na wykresie podano średnią z obliczonym odchyleniem standardowym. Dane analizowane ANOVA ($p < 0,05$).

Ze względu na bliskie sąsiedztwo sekwencji 2, 3 i 4 w białku, postanowiono zmapować dokładnie ten wysoce reaktywny region białka Cwp22 (**Rysunek 10**). Sekwencja obejmująca peptydy 2, 3 i 4 (³⁸SRKNTLGYFVNNKLVKEFRVATGKKGSETPTGKTKVVKIKNRPYYKGNIP^G⁹⁰) zawiera się w domenie YkuD białka Cwp22, która jest odpowiedzialna za funkcjonalność tego białka. W celu dokładnego zmapowania tego regionu zaprojektowano szereg peptydów o zachodzących na siebie sekwencjach z przesunięciem o dwa aminokwasy. Wszystkie peptydy zostały zsyntezowane i nadano im kolejne numery z literą A celem łatwiejszej identyfikacji. Do określenia poziomu reaktywności uzyskanych peptydów wykorzystano surowice dwóch grup o najwyższej aktywności, czyli grupy pacjentów z CDI oraz grupy surowic krwi pępowinowej. W przypadku tej analizy ELISA, zastosowanie testu statystycznego nie było możliwe ze względu na to, że mapowano wysoce immunoreaktywne sekwencje i określenie poziomu tła nie ma w tym przypadku zastosowania. Wynik mapowania wysoce reaktywnego regionu peptydów 2, 3, 4 pozwolił na wybór dwóch peptydów o najwyższej immunoreaktywności, czyli A6 i A8, których sekwencje nachodzą na siebie. Do szczegółowej analizy wybrano jeden długi peptyd, w którym zawierają się sekwencje A6 i A8, którego sekwencja aminokwasowa to NNKLVKEFRVATGKKGSETP.

Do szczegółowego mapowania wytypowano również peptydy nr 11 (GTYQKNSWLKVNGKMY) i 14 (QTGWQEKNGKKYYLGS) ze względu na ich najwyższą immunoreaktywność z surowicami pacjentów z CDI jak i z surowicami krwi pępowinowej.



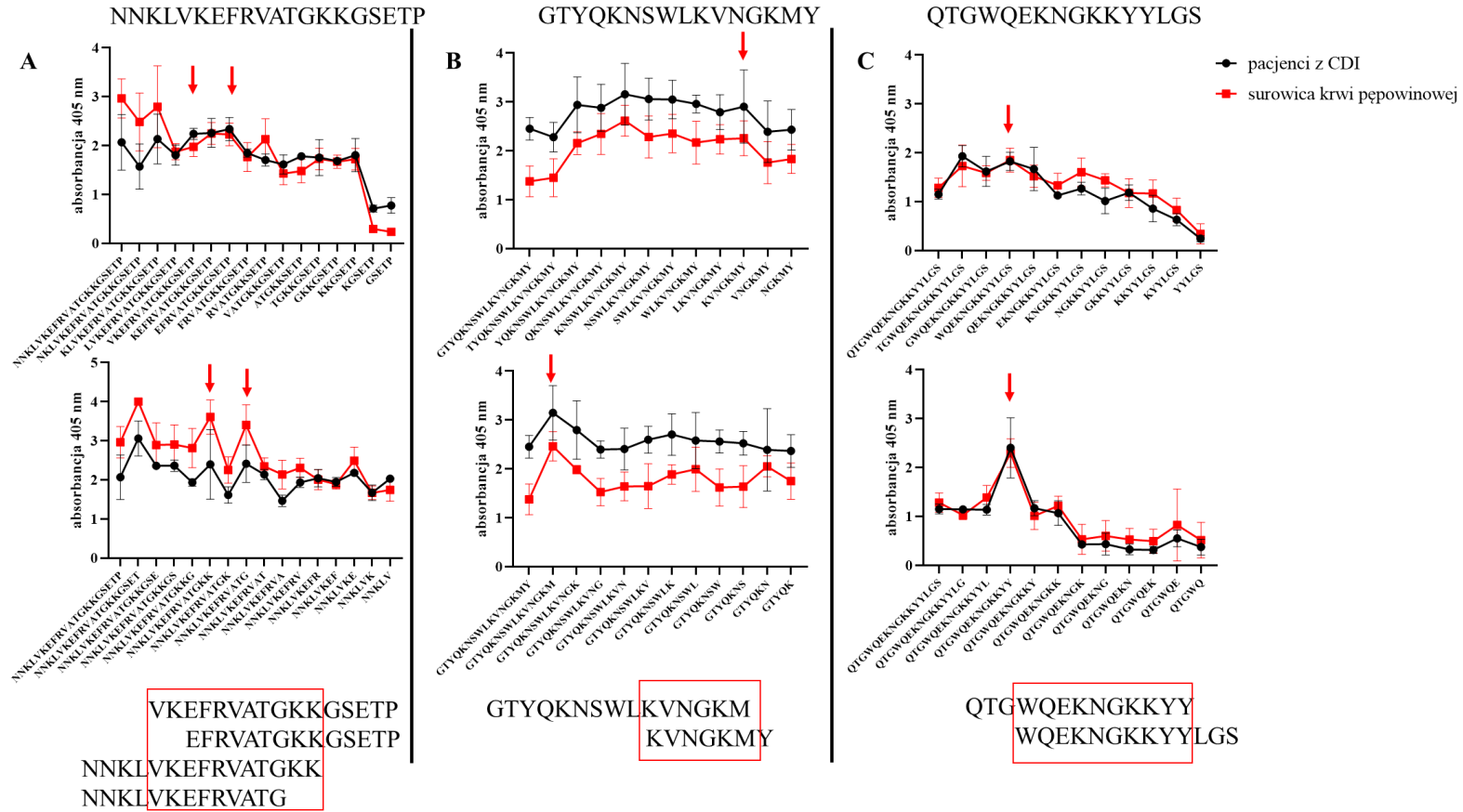
Rysunek 10 Wynik mapowania regionu sekwencji 2, 3, 4 białka Cwp22. Rys. 10A Sekwencje zsyntezowanych peptydów wysoce reaktywnego regionu białka Cwp22. Rys. 10B Wynik badania immunoreaktywności zsyntezowanych peptydów wysoce reaktywnego regionu białka Cwp22 z surowicami badanych grup. Immunoreaktywność zsyntezowanych peptydów została zbadana w teście ELISA z użyciem połączonych surowic dwóch grup w rozcieńczeniu 1:100. Oznaczenie zostało powtórzone co najmniej 4 razy. Na wykresie podano średnią z obliczonym odchyleniem standardowym.

W kolejnym kroku określono dokładne epitopy w peptydach NNKLVKEFRVATGKKGSETP (A6-A8), GTYQKNSWLKVNGKMY (11) i QTGWQEKNNGKKYYLGS (14) (**Rysunek 11**). Zsyntezowano szereg peptydów opartych o powyższe sekwencje, ale skróconych od N- i C-końca po jednym aminokwasie, aż do uzyskania krótkich 5-aminokwasowych sekwencji. W tej analizie użyto surowic dwóch grup: grupy pacjentów z CDI oraz grupy surowic krwi pępowinowej. Porównano sekwencje najkrótszych peptydów, które wykazują silną immunoreaktywność i nałożono je na siebie celem wyznaczenia epitopu.

W wyniku analizy, zidentyfikowano najkrótsze peptydy immunoreaktywne dla wszystkich trzech badanych sekwencji: A6-A8, 11 i 14 (**Rysunek 11**). Epitop zidentyfikowany dla sekwencji A6-A8 (NNKLVKEFRVATGKKGSETP) to ⁵²VKEFRVATGKK⁶². Sekwencja tego epitopu została otrzymana poprzez nałożenie na siebie najkrótszych immunoreaktywnych sekwencji i wyodrębnienie części wspólnej. Co ciekawe, w przypadku tego epitopu stwierdzono wyższą reaktywność w przypadku użycia surowicy krwi pępowinowej. Może to wskazywać na silne właściwości ochronne tego epitopu. Warto również podkreślić, że sekwencja ATGKK została zidentyfikowana jako prawdopodobny epitop *in silico* przez program BEPIPred (**Tabela 13**) i jest ona zlokalizowana w eksponowanej pętli (**Rysunek 7**).

Dla sekwencji nr 11 (GTYQKNSWLKVNGKMY) zidentyfikowano epitop ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶. Nałożono na siebie dwie najkrótsze sekwencje o najwyższej immunoreaktywności, część wspólną tworzy epitop ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶. Ta sekwencja nie została zaproponowana jako potencjalny epitop przez żaden z użytych programów. Epitop ten jest zlokalizowany w konserwatywnej domenie COG5263 wiążącej cholinę, prawdopodobnie jednak w rejonie słabo eksponowanym (**Rysunek 7**) [261].

Dla sekwencji nr 14 (QTGWQEKNNGKKYYLGS) zidentyfikowano epitop ²⁶⁸WQEKNNGKKYY²⁷⁷, który został w całości zidentyfikowany w analizie *in silico* (**Tabela 13**). Epitop ten częściowo jest zlokalizowany w wolnej pętli białka Cwp22 (**Rysunek 7**).






Rysunek 11 Poszukiwanie epitopu. Przeprowadzono analizę sekwencji aminokasowej peptydów opartą o analizę immunoreaktywności skróconych sekwencji. Nałożono na siebie najkrótsze immunoreaktywne sekwencje, wspólne sekwencje tworzą epitop. Rys. 11A skracanie sekwencji NNKLVKEFRVATGKKKGSETP. Rys. 11B skracanie sekwencji GTYQKNSWLKVNKGKMY. Rys. 11C skracanie sekwencji QTGWQEKNKGKYYLGS. Czerwone strzałki oznaczają immunoreaktywne peptydy o najkrótszych sekwencjach, czyli takie, w których usunięcie kolejnego aminokwasu nie powoduje spadku reaktywności.

Podsumowując, zidentyfikowano trzy nowe epitopy białka Cwp22 bakterii CD. Są to ⁵²VKEFRVATGKK⁶², ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷. Przy czym, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ został w całości zidentyfikowany dzięki procedurze mapowania epitopów z użyciem chemicznej syntezy peptydów. Pozostałe dwa epitopy lub ich fragmenty, zostały wskazane jako prawdopodobne w analizie *in silico*.

7.1.5. Charakterystyka zidentyfikowanych epitopów białka Cwp22

Uzyskane epitopy scharakteryzowano, z użyciem narzędzi bioinformatycznych, pod kątem właściwości fizykochemicznych, takich jak masa molekularna, rozpuszczalność w wodzie, pI, ładunek w fizjologicznym pH oraz struktura II-rzędowa (Tabela 14). Wszystkie uzyskane peptydy są dobrze rozpuszczalne w wodzie.

Tabela 14 Charakterystyka uzyskanych epitopów.

	⁵² VKEFRVATGKK ⁶²	²⁰¹ KVNGKM ²⁰⁶	²⁶⁸ WQEKNGKKYY ²⁷⁷
Masa molekularna [g/mol]	1262,5	675,84	1343,49
Rozpuszczalność w wodzie	dobra	dobra	dobra
pI	10,95	10,69	9,9
Ładunek w fizjologicznym pH	3	2	2
Struktura peptydu			

Przeprowadzono immunoinformatyczną analizę reaktywności krzyżowej i autoimmunoreaktywności otrzymanych epitopów. Celem określenia czy immunizacja epitopami białka Cwp22 może prowadzić do reaktywności krzyżowej z innymi szczepami bakteryjnymi sprawdzono rozpowszechnienie sekwencji epitopów ⁵²VKEFRVATGKK⁶², ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷ w bazie wszystkich dostępnych sekwencji (BLAST).

Sekwencja ⁵²VKEFRVATGKK⁶² została znaleziona tylko w jednym organizmie,

poza *Clostridium difficile*, którym jest *Paenibacillus rhizosphaerae*. Sekwencja ta występuje w białku hipotetycznym. *Paenibacillus rhizosphaerae* należy do tej samej gromady bakterii co CD (Firmicutes), są więc spokrewnione, a jest to szczep bakteryjny wyizolowany z ryzosfery ciecierzycy pospolitej [262]. Ze względu na występowanie tej bakterii poza organizmem człowieka prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji krzyżowych pomiędzy tymi białkami w organizmie człowieka wydaje się być znikome i nie ogranicza możliwości zastosowania tego epitopu w potencjalnej szczepionce przeciwko CD.

W przypadku sekwencji ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ występuje ona w wielu organizmach, takich jak *Plasmodium malariae* (antygen związany z błoną erytrocytów), *Fusobacterium varium* (białko zawierające domenę autotransportera), *Serratia marcescens* (fimbria/pilus) i wiele innych. Może to istotnie ograniczać możliwość zastosowania tego epitopu w szczepionce przeciwko CD.

W przypadku epitopu ²⁶⁸WQEKNNGKKYY²⁷⁷ nie odnaleziono tej sekwencji w żadnym z opisanych jak dotąd białek. Według obecnego stanu wiedzy ta sekwencja jest specyficzna tylko dla *Clostridioides difficile*.

Celem sprawdzenia, czy sekwencje epitopów mogą wykazywać właściwości autoimmunoreaktywne sprawdzono, czy ich sekwencje aminokwasowe występują w bazie znanych epitopów i autoepitopów (IEDB). Przeszukania nie ograniczono do konkretnego organizmu czy typu MHC.

Przeszukanie bazy znanych epitopów i autoepitopów pod kątem sekwencji epitopu ⁵²VKEFRVATGKK⁶² wykazało, że podobna, aczkolwiek niepełna, sekwencja występuje w epitopie opisanym dla stafylokinazy (TAYKEFRVAEADPSAKI) produkowanej przez *Staphylococcus aureus*. Stafylokinaza jest selektywnym aktywatorem plazminogenu, która mogłaby być stosowana w leczeniu chorób układu krążenia [263]. U człowieka zidentyfikowano limfocyty T specyficzne względem epitopu stafylokinazy [264], wpływ obecności takich limfocytów na działanie ewentualnej szczepionki jest na tym etapie trudny do określenia. Przeszukanie bazy wykazało brak znanych epitopów i autoepitopów dla sekwencji ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶. W przypadku sekwencji ²⁶⁸WQEKNNGKKYY²⁷⁷ znaleziono częściowo pokrywającą się sekwencję występującą w białku laseczki wąglika DNGKKYYLLE, dla której sugerowano możliwe powodowanie autoimmunoreaktywności u myszy, jednakże testy ELISA tego nie potwierdziły [265].

Podsumowując, wynik powyższej analizy reaktywności krzyżowej

i autoimmunoreaktywności nie eliminuje jednoznacznie żadnego z zidentyfikowanych powyżej epitopów. Należy jednak dokładnie zbadać występowanie sekwencji $^{201}\text{KVNGKM}^{206}$ oraz możliwe reakcje krzyżowe przed użyciem jej jako antygeny szczepionkowego. Przykładowo, badając reaktywność krzyżową $^{201}\text{KVNGKM}^{206}$ z surowicą krwi otrzymaną od myszy immunizowanych białkiem, w którym podobna sekwencja się znajduje.

7.2. Nanoadiuwant

Badania nad nanoadiuwantami (NAC) miały na celu przygotowanie i scharakteryzowanie szeregu nowych adiuwantów, które mogłyby być zastosowane w szczepionkach dośluzówkowych. Przeprowadzono szczegółową analizę właściwości fizykochemicznych i biologicznych NAC, w szczególności pod kątem ich zastosowania w szczepionkach donosowych.

7.2.1. Badanie stabilności NAC

Przygotowano zestaw 13 stabilnych NAC o zróżnicowanym składzie. **Tabela 7** (sekcja Metody) zawiera listę wszystkich przygotowanych NAC oraz ich składniki. Na nanoadiuwant składają się olej silikonowy, detergent jonowy i niejonowy, rozpuszczalnik organiczny i woda ultraczysta. Rozmiar pęcherzyków przygotowanych NAC zawiera się między 383, a 623,6 nm (**Tabela 15**, czas 0). Poza wielkością cząstek zmierzono również indeks polidispersyjności (PDI), który opisuje miarę heterogenności cząstek. Wartości PDI poniżej 0,1 określają silnie monodispersyjne formułacje, wartości pomiędzy 0,1, a 0,4 określają średnio heterogenne formułacje, a wartości powyżej 0,4 określają zawiesiny silnie polidispersyjne [266]. Wartości PDI dla NAC na początku pomiarów wynoszą od 0,197 (NAC12) do 0,343 (NAC10), a jedynie dla NAC13 ten parametr wyniósł 0,468 (**Tabela 15**), co oznacza, że dwanaście z trzynastu NAC są umiarkowanie polidispersyjne. Istnieje korelacja pomiędzy wielkością cząstek, a wartością PDI – wynik testu korelacji Pearsona wynosi 0,79 co oznacza, że im większe pęcherzyki tym bardziej heterogenne. Zależność ta jest zgodna z podstawowymi zasadami mechaniki płynów [267].

Potencjał zeta kropeł NAC jest determinowany przez rodzaj użytego detergentu kationowego, ale nie ma on wpływu na wielkość pęcherzyków NAC. Potencjał zeta otrzymanych NAC jest dodatni i wynosi pomiędzy 24,4, a 65,2 mV (**Tabela 16**).

Podsumowując, uzyskano zestaw NAC o zróżnicowanych parametrach fizykochemicznych.

Kolejnym krokiem było zbadanie czy parametry fizykochemiczne NAC pozostają stabilne przez 12 miesięcy przechowywania. NAC przechowywane w temperaturze 4 °C nie wykazywały wizualnych oznak niestabilności, takich jak śmietankowanie, czy rozdział na fazy. Wyniki pomiarów wielkości kropeł i potencjału zeta prowadzone przez 12 miesięcy nie wykazały istotnych zmian w wielkości kropeł (**Tabela 15**) ani potencjale zeta (**Tabela 16**) u dziewięciu (NAC2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13) z 13 NAC. Trzy pozostałe NAC (NAC8, 11 i 12) wykazały istotne odchylenie od rozkładu normalnego jedynie przy badaniu wielkości kropeł ($p < 0,05$), a jedno NAC (NAC1) wykazało zarówno istotne odchylenie dla wielkości kropeł jak i potencjału zeta. W kolejnych eksperymentach użyto 9 stabilnych NAC (NAC2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13).

Tabela 15 Wpływ długotrwałego przechowywania na wielkość kropeł NAC.

nazwa	miesiące							
	0	1	2	3	4	5	6	12
NAC1*	388,8 (0,207)	387,3 (0,203)	390 (0,212)	395,8 (0,223)	390,5 (0,198)	410,1 (0,235)	391 (0,218)	410,2 (0,235)
NAC2	411 (0,304)	399,9 (0,245)	378,3 (0,203)	377,4 (0,207)	409 (0,249)	416,1 (0,289)	392,5 (0,23)	394,1 (0,236)
NAC3	534 (0,31)	472,6 (0,311)	512,1 (0,362)	467,5 (0,312)	472,2 (0,274)	492,8 (0,312)	506,6 (0,354)	458 (0,257)
NAC4	400,2 (0,22)	367,4 (0,205)	376,2 (0,215)	379,9 (0,23)	382,1 (0,233)	392,4 (0,253)	408,2 (0,305)	381,7 (0,218)
NAC5	566 (0,312)	581,6 (0,345)	599,1 (0,353)	547,5 (0,31)	654 (0,468)	590,7 (0,34)	598,4 (0,394)	558,5 (0,299)
NAC6	526 (0,251)	515,03 (0,273)	527,3 (0,308)	493,3 (0,252)	503,3 (0,264)	526,1 (0,296)	505,5 (0,259)	494,9 (0,249)
NAC7	405,5 (0,265)	386,2 (0,254)	390,6 (0,26)	370,9 (0,211)	374,2 (0,23)	367,9 (0,209)	394,3 (0,246)	369,5 (0,217)
NAC8*	529,4 (0,31)	520,9 (0,296)	508,6 (0,285)	520,1 (0,309)	508,4 (0,266)	530,1 (0,299)	578,2 (0,428)	518,9 (0,284)
NAC9	452,8 (0,247)	441,8 (0,239)	452,5 (0,286)	438,5 (0,224)	454,2 (0,263)	463,9 (0,283)	465,8 (0,299)	486,4 (0,345)
NAC10	473,6 (0,343)	432,2 (0,234)	455,7 (0,285)	421,4 (0,221)	431,3 (0,229)	448 (0,259)	459,2 (0,293)	430 (0,212)
NAC11*	383,1 (0,22)	373,9 (0,212)	373,4 (0,207)	376,5 (0,21)	376,4 (0,211)	406,8 (0,281)	378,4 (0,205)	384,8 (0,219)
NAC12*	405,3 (0,197)	409,7 (0,206)	441,4 (0,298)	404,4 (0,177)	404,8 (0,194)	412,8 (0,218)	475 (0,366)	405,6 (0,17)
NAC13	623,6 (0,468)	565 (0,387)	542,8 (0,349)	580,4 (0,4)	553,9 (0,359)	604,4 (0,4)	565,7 (0,367)	551,8 (0,334)

Pomiary potencjału zeta zostały wykonane w 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 12 miesiącu przechowywania. W nawiasach podano wartości PDI. Obliczono czy odchylenia wielkości są statystycznie istotnie różne od rozkładu normalnego, zakładając, że $p < 0,05$. Nanoadiuwanty, dla których odchylenia w wielkości kropeł są różne od rozkładu normalnego zostały zaznaczone gwiazdką ($p < 0,05$).

Tabela 16 Wpływ długotrwałego przechowywania na potencjał zeta NAC.

nazwa	miesiące							
	0	1	2	3	4	5	6	12
NAC1*	44,4	60,5	61,2	64,1	59	61,5	60,4	60,5
NAC2	56,2	59,7	57,5	63,1	54,9	58,9	58,6	58,3
NAC3	30,4	39,1	36,5	39,9	35,8	40,4	35,1	43,6
NAC4	24,4	31,7	28,7	29,2	28,7	31,9	30	30
NAC5	65,2	68,2	66,9	71,3	65,9	68,6	65,3	74,8
NAC6	30,5	38	38,1	39,6	39	43,5	39,1	41,1
NAC7	31,6	38,5	35,7	33,6	32,3	38,1	33,6	39,5
NAC8	56,9	59,4	58,6	62,1	58,3	60,9	60	59,2
NAC9	57,1	63,7	62,5	65,6	53,5	63,1	62,7	61,9
NAC10	63	65,1	66,2	67,1	63,7	66,6	64,2	67,9
NAC11	28	30,3	28,1	30,3	28,2	29,6	30,5	29,4
NAC12	36,1	47,8	42,1	42,5	45,1	45,2	44,6	44,5
NAC13	64,4	66,7	64,3	70,8	65	65,8	62,4	56,4

Pomiary potencjału zeta zostały wykonane w 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 12 miesiącu przechowywania. Obliczono czy odchylenia ZP są statystycznie istotnie różne od rozkładu normalnego, zakładając że $p < 0,05$. Nanoadiuwanty, dla których odchylenia w ZP są różne od rozkładu normalnego zostały zaznaczone gwiazdką ($p < 0,05$).

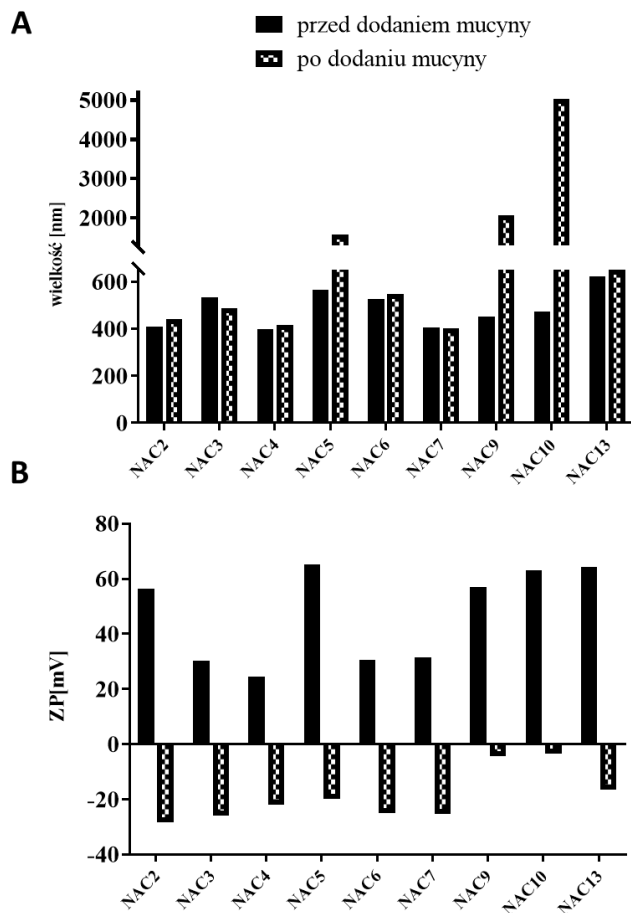
7.2.2. Badanie bioadhezji NAC do mucyny

Mucyna to silnie glikozylowane, ujemnie naładowane białko, które tworzy fizyczną barierę oddzielającą nabłonki organizmu od środowiska zewnętrznego. Jedną z podstawowych właściwości, którą powinna posiadać szczepionka dośluzówkowa jest wykazywanie bioadhezji do tego białka [109]. Zbadano oddziaływanie 9 stabilnych NAC (NAC2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13) z mucyną. Badanie tych oddziaływań polegało na pomiarze wielkości pęcherzyków i potencjału zeta NAC przed i po dodaniu mucyny do roztworu. Potencjał zeta mucyny w pH 7 wynosi -22,2 mV.

Wszystkie badane NAC zmieniły wartości potencjału zeta z dodatniego na ujemny po dodaniu do nich mucyny, ale tylko u trzech NAC zaobserwowano znaczne zwiększenie rozmiaru kropli (**Rysunek 12**). U dwóch z nich, NAC9 i 10, po dodaniu mucyny, potencjał zeta jest znacznie wyższy niż dla pozostałych. NAC, które znacznie

zwiększyły wielkość kropeł (NAC5, 9 i 10) zawierały w swoim składzie jeden z dwóch detergentów kationowych: CPC lub BDMHDAC. Zróżnicowana, zależna od rodzaju detergentu odpowiedź na dodanie mucyny, została już opisana w literaturze [120]. Wielkość cząsteczki mucyny zawiera się pomiędzy 10, a 300 nm [267]. Wydaje się więc, że oddziaływanie NAC, których wielkość pęcherzyków to co najmniej 300 nm, z mucyną może polegać na wiązaniu mucyny do powierzchni lub na ładowaniu mucyny do wnętrza kropeł NAC.

Podsumowując, wszystkie badane NAC oddziałują z mucyną, ale dokładny charakter tych oddziaływań nie został określony. Trzy NAC (NAC5, 9 i 10) odmiennie odpowiedziały na dodatek mucyny niż pozostałe dziewięć. Być może specyficzne właściwości poszczególnych detergentów determinują możliwość wejścia cząsteczek mucyny do wnętrza lub jej opłaszczenia na powierzchni. Efekt biologiczny tych oddziaływań powinien zostać zbadany *in vitro*, np. z użyciem linii komórkowych wytwarzających śluz zawierający mucynę [268].



C

nazwa	wielkość [nm]		ZP [mV]	
	NAC	NAC + mucyna	NAC	NAC + mucyna
NAC2	411	440,6	56,2	-28,5
NAC3	534	489	30,4	-26,1
NAC4	400,2	418,2	24,4	-22,1
NAC5	566	1579	65,2	-19,9
NAC6	526	547	30,5	-25,2
NAC7	405,5	401,3	31,6	-25,3
NAC9	452,8	2059	57,1	-4,4
NAC10	473,6	5037	63	-3,4
NAC13	623,6	649,3	64,4	-16,4

Rysunek 12 Oddziaływania NAC z mucyną. 0,1 % NAC inkubowano z mucyną (końcowe stężenie 47,6 $\mu\text{g/ml}$) przez 5 min w temperaturze pokojowej. Mieszaninę rozcieńczono przed pomiarem wielkości i potencjału zeta do stężenia 0,1% NAC. Zmierzono wielkość i potencjał zeta kropeł NAC przed i po dodaniu mucyny. Rys. 12A prezentuje zmianę wielkości kropeł po dodaniu mucyny. Rys. 12B prezentuje zmianę potencjału zeta po dodaniu mucyny. Rys. 12C prezentuje wszystkie zebrane pomiary.

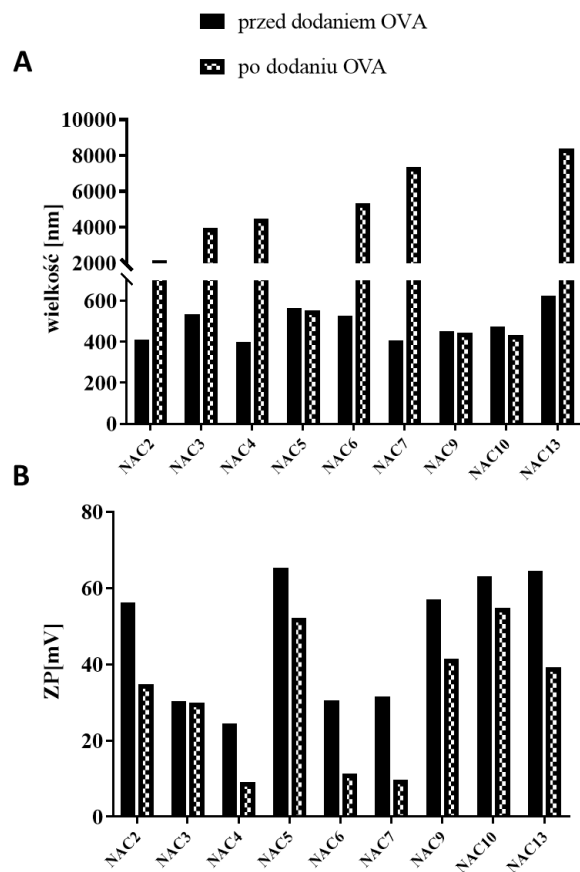
7.2.3. Charakterystyka oddziaływań NAC z owalbuminą

Owalbumina (OVA) jest bardzo dobrze poznanym i opisanym białkiem, często używanym w badaniach immunologicznych. Oddziaływania NAC z OVA jako modelowym białkiem zostały zbadane w trzech typach eksperymentów. W pierwszym, zbadano wpływ dodatku OVA na parametry fizyczne NAC, takie jak wielkość kropeł i potencjał zeta. W drugim, określono trwałość oddziaływania NAC z OVA, a w trzecim, wynikający z tych oddziaływań wpływ NAC na stabilność OVA.

W pierwszym typie eksperymentów zbadano jak dodatek OVA wpływa na parametry fizykochemiczne dziewięciu stabilnych NAC (NAC2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13). Zmierzono rozmiar kropeł i ich potencjał zeta przed i po podaniu owalbuminy (końcowe stężenie to 1 mg/ml OVA w 20% NAC). Warto wspomnieć, że w zastosowanym w tych eksperymentach pH = 7, OVA ma ładunek ujemny, potencjał zeta OVA wynosi -13,2 mV.

Wielkość kropeł sześciu (NAC2, 3, 4, 6, 7 i 13) z dziewięciu NAC uległa znacznemu powiększeniu po dodaniu owalbuminy, co wskazuje na oddziaływanie między NAC i modelowym białkiem (**Rysunek 13A**). U pięciu z nich, NAC2, 4, 6, 7 i 13, dodatkowo, zaobserwowano obniżenie potencjału zeta pęcherzyków, co również potwierdza oddziaływanie z owalbuminą (**Rysunek 13B**). **Rysunek 13C** podsumowuje wyniki uzyskane dla wszystkich pomiarów. Dla pięciu NAC zaobserwowano liniową zależność wielkości kropeł od potencjału zeta – im większa kropla tym potencjał zeta bardziej dodatni. Wielkość kropeł NAC5, 9 i 10 nie uległa zmianie po dodaniu OVA, ale jednocześnie obniżeniu uległ ich potencjał zeta. Co ciekawe, są to te same nanoadiuwanty, których wielkość kropeł uległa powiększeniu w eksperymencie z mucyną, czyli nanoadiuwanty zawierające w swoim składzie CPC lub BDMHDAC (detergenty kationowe) (**Rysunek 12**).

Podsumowując, dodatek OVA do nanoadiuwantu może dać dwojaki efekt: bardzo duże powiększenie kropeł lub brak większych zmian w rozmiarze kropeł. Oba efekty wiążą się z obniżeniem potencjału zeta i wydają się być zależne od rodzaju zastosowanego detergentu kationowego ale niekoniecznie od samego potencjału zeta kropeł. Być może na to oddziaływanie wpływają dodatkowo oddziaływania strukturalne pomiędzy składnikami NAC, które ułatwiają lub uniemożliwiają ładowanie białka do wnętrza kropeł.

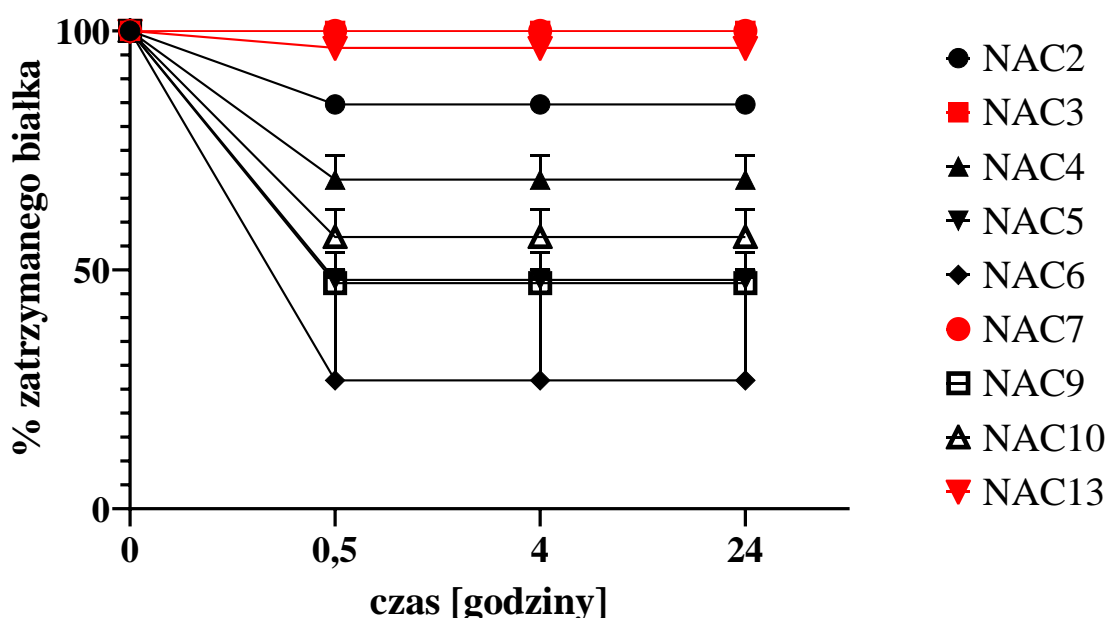


C

nazwa	wielkość [nm]		ZP [mV]	
	NAC	NAC + OVA	NAC	NAC + OVA
NAC2	411	2158	56,2	34,7
NAC3	534	3962	30,4	30
NAC4	400,2	4462	24,4	9,1
NAC5	566	554,2	65,2	52,1
NAC6	526	5320	30,5	11,3
NAC7	405,5	7345	31,6	9,8
NAC9	452,8	443,4	57,1	41,4
NAC10	473,6	434,5	63	54,8
NAC13	623,6	8392	64,4	39,3

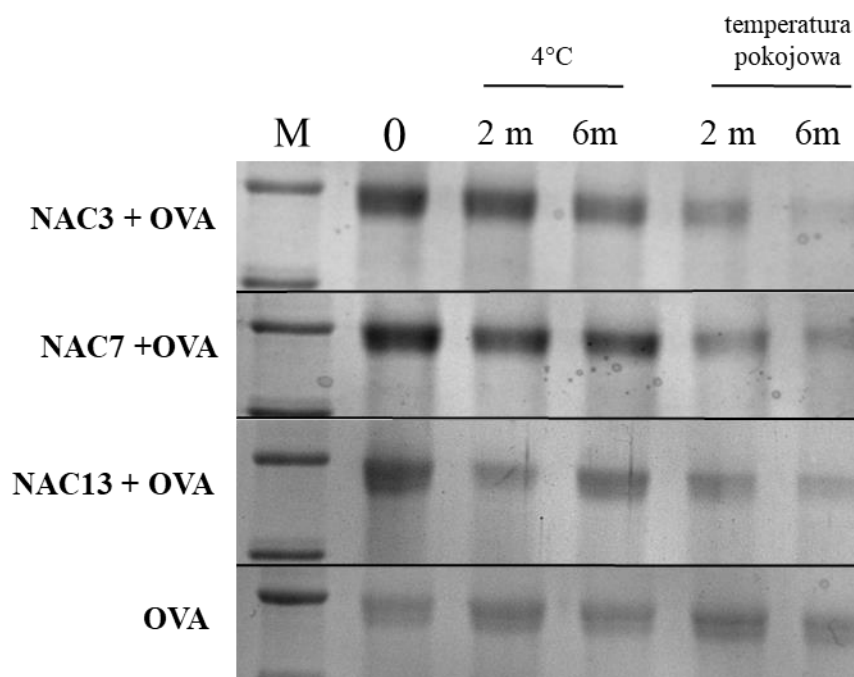
Rysunek 13 Wpływ dodatku białka modelowego OVA na parametry NAC. 1 mg/ml OVA inkubowano w 20% NAC przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę rozcieńczono przed pomiarem wielkości i potencjału zeta do stężenia 0,1% NAC. Rys. 13A pokazuje zmiany wielkości NAC przed i po dodaniu OVA. Rys. 13B pokazuje zmiany potencjału zeta przed i po dodaniu OVA. Rys. 13C podsumowuje wszystkie uzyskane wyniki.

W drugim typie eksperymentów zbadano kinetykę uwalniania owalbuminy z dziewięciu NAC (NAC2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13) (**Rysunek 14**). Uwalnianie OVA zbadano z użyciem filtrów o porach wielkości 0,1 μm . Krople nanoadiuwantu są większe niż 0,1 μm przez co nie przechodzą do supernatantu, tak jak i związane z nimi lub w ich wnętrzu, białko. Nie stwierdzono obecności białka w supernatancie w przypadku mieszaniny OVA z jedną z dwóch NAC (NAC3 i 7), a w przypadku NAC13 były to ilości śladowe, co wskazuje na związanie OVA z tymi NAC. Te same nanoadiuwanty zwiększały rozmiar kropli po dodaniu OVA (**Rysunek 13A**). Mniej niż 50% białka zatrzymały NAC5, 6 i 9. Oddziaływanie trwało przez co najmniej 24 godziny czyli przez cały czas trwania eksperymentu.



Rysunek 14 Wiązanie owalbuminy przez NAC. Mieszanina NAC i OVA została rozdzielona na filtrach o wielkości por 0,1 μm . Oznaczono zawartość białka w supernatancie i odjęto ją od wyjściowej ilości białka (100%) użytego w eksperymencie. Eksperyment wykonano trzykrotnie.

W trzecim typie eksperymentu zbadano wpływ dziewięciu stabilnych NAC (NAC2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13) na integralność białka modelowego (**Rysunek 15**). Po 6 miesięcznej inkubacji nanoadiuwantów z OVA jedynie trzy z 9 NAC utrzymały integralność OVA gdy przechowywane były w 4 $^{\circ}\text{C}$ (NAC3, 7 i 13). Są to te same nanoadiuwanty, które wykazały najwyższą ilość związanej OVA (**Rysunek 14**).



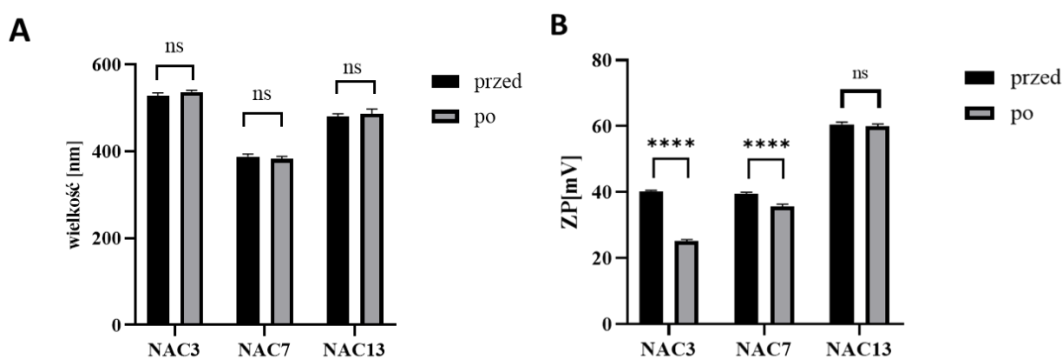
Rysunek 15 Wpływ NAC na integralność białka modelowego. Formulacje składające się z NAC i OVA były przechowywane w temp. 4 °C i temp. pokojowej przez 6 miesięcy. Pobierano próbki w czasie „0”, po 2 miesiącach i po 6 miesiącach. Wpływ NAC na integralność białka zbadano za pomocą SDS-PAGE (żel 12,5%). Białka zwizualizowano z użyciem Coomassie Brilliant Blue.

Podsumowując, na podstawie powyższych danych dotyczących wiązania i wpływu na białko modelowe wytypowano 3 NAC (NAC3, 7 i 13), których użyto do dalszych eksperymentów. Wszystkie te nanoadiuwanty zachowują swoje właściwości co najmniej przez rok, oddziałują z mucyną i owalbuminą. Co więcej, nie degradują zawieszonego w nich białka.

7.2.4. Wpływ sterylizacji na właściwości fizykochemiczne NAC

Zanim szczepionka trafi do sprzedaży musi przejść proces sterylizacji, a wszystkie składniki zawarte w tej szczepionce powinny nienaruszone przetrwać ten proces. Istnieje kilka metod sterylizacji cieczy, np. filtracja, mikrofalę, sterylizacja radiacyjna lub sterylizacja termiczna w autoklawie. Ze względu na wielkość kropeł NAC nie można zastosować filtracji przez filtry o porach 0,22 µm. Zbadano, czy sterylizacja poprzez proces autoklawowania wpływa na właściwości fizykochemiczne NAC (**Rysunek 16**). Po sterylizacji, nie zaobserwowano wizualnych oznak utraty stabilności przez NAC.

Pomiar parametrów fizykochemicznych wykazał, że sterylizacja termiczna nie wpływa na wielkość kropeł NAC, ale może obniżać potencjał zeta kropeł, co zaobserwowano w przypadku NAC3 i NAC7 (**Rysunek 16B**). NAC3 i NAC7 zawierają ten sam detergent kationowy BDMDDAC, NAC13 zawiera CBP. Prawdopodobnie CBP wykazuje większą odporność na działanie wysokiej temperatury.



Rysunek 16 Wpływ sterylizacji na właściwości NAC. Rysunek 16A pokazuje wielkość NAC przed i po sterylizacji. Rysunek 16B pokazuje potencjał zeta NAC przed i po sterylizacji. Dane analizowano z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ($p < 0,05$). Eksperyment powtórzono trzykrotnie.

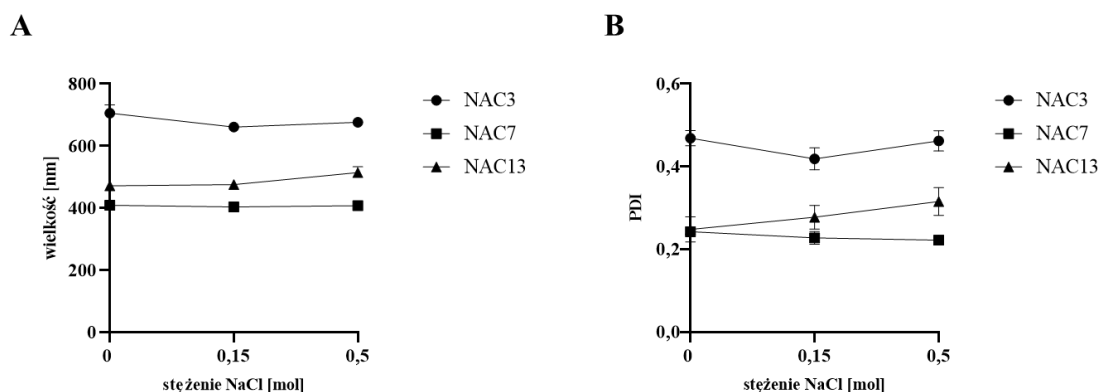
Podsumowując, sterylizacja za pomocą wysokiej temperatury nie wpływa na wielkość kropeł badanych NAC. Proces ten może obniżać potencjał zeta NAC ale nie wiadomo jak taka zmiana wpływa na właściwości biologiczne NAC.

7.2.5. Wpływ warunków panujących w jamie nosowej na stabilność NAC

Nanoadiuwanty zostały zaprojektowane jako adiuwanty donosowe, ze względu na liczne zalety tej drogi podania szczepionki: łatwość aplikacji, ułatwiony dostęp do komórek układu immunologicznego obecnych w śluzówce nosa czy też brak silnie degradującego środowiska w jamie nosowej. Niemniej jednak, warunki panujące w jamie nosowej nie są stałe, zmieniają się pod kątem temperatury, pH i zawartości soli w wysięlającym jamę nosową śluzie. Te zmiany mogą wpływać na właściwości nanoadiuwantu. Bazując na danych literaturowych zawężono zakres badanych stężeń soli [269] oraz pH [253] do tych, które mogą występować w jamie nosowej.

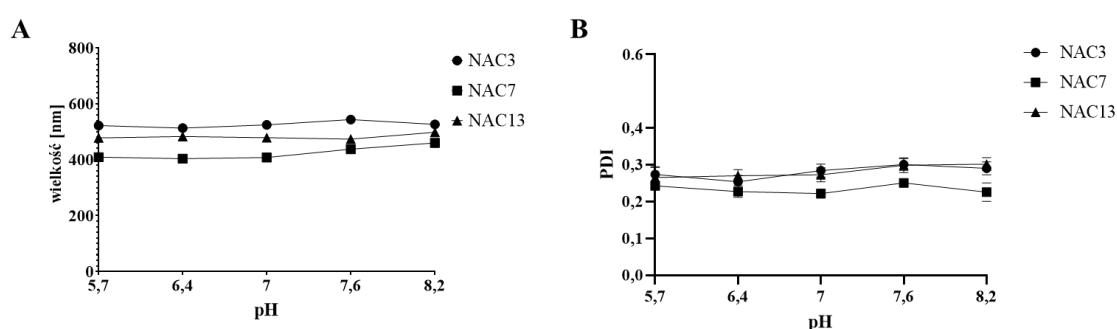
W badanym zakresie stężeń soli NaCl (0-0,5 M) nie wykazano istotnych statystycznie zmian w wielkości i heterogenności kropełek NAC (**Rysunek 17**).

Jednakże, zaobserwowano, dla badanych stężeń soli, tendencję wzrostową parametru PDI zmierzoną dla nanoadiuwantu NAC13.



Rysunek 17 Wpływ fizjologicznych zakresów stężeń soli na właściwości fizykochemiczne NAC. Rys. 17A prezentuje zmiany wielkości NAC w różnym stężeniu soli NaCl. Rys. 17B prezentuje zmiany parametru PDI w różnym stężeniu soli NaCl. Dane analizowane były testem Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

W badanym zakresie fizjologicznego pH (5,7-8,2) nie wykazano istotnych statystycznie zmian w wielkości i heterogenności kropelek NAC (**Rysunek 18**). Rozmiar kropelek NAC7 wykazuje tendencję do zwiększania się w miarę wzrostu pH roztworu, w którym się znajduje. Największe wartości odchyłeń dla średniej zanotowano dla parametru PDI przy pH równym 8,2.



Rysunek 18 Wpływ fizjologicznych zakresów pH na właściwości fizykochemiczne NAC. Rys. 18A prezentuje zmiany wielkości NAC w zakresie pH jakie może występować w jamie nosowej człowieka. Rys. 18B prezentuje zmiany parametru PDI w w zakresie pH jakie może występować w jamie nosowej człowieka. Dane analizowane były testem Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

Podsumowując, badane NAC zachowują swoje właściwości fizykochemiczne w warunkach fizjologicznych jamy nosowej. Są również odporne na ewentualne zmiany tych warunków.

7.2.6. Badanie cytotoksyczności NAC względem komórek układu immunologicznego

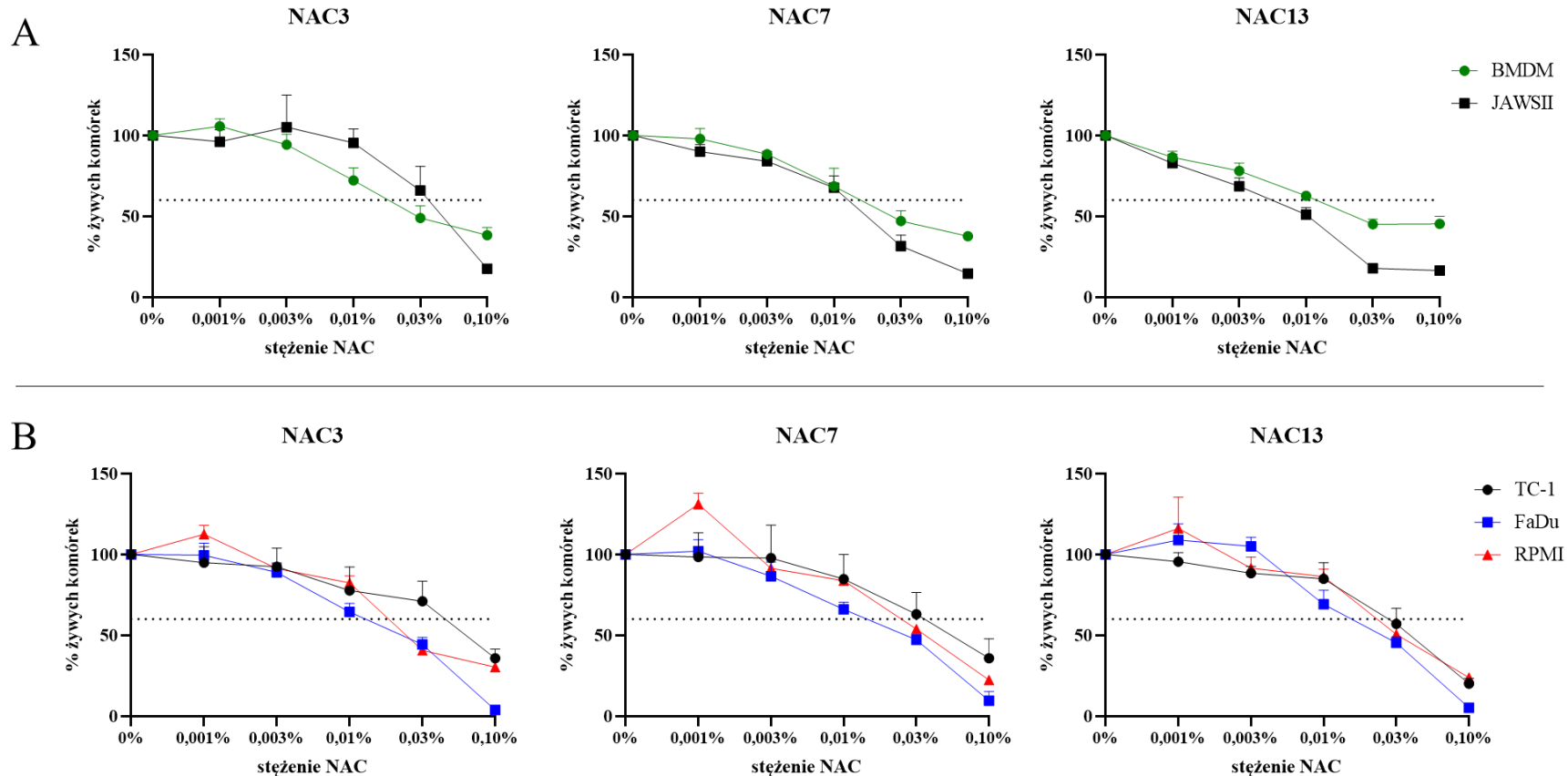
Liczne doniesienia literaturowe wskazują na to, że umierające komórki stymulują komórki dendrytyczne do dojrzewania i prezentacji antygenów komórkom immunokompetentnym [270,271]. W trakcie śmierci komórek dochodzi do wyzwolenia sygnałów niebezpieczeństwa, które mają na celu mobilizację układu odpornościowego. Zbadano jak NAC3, 7 i 13 wpływają na żywotność komórek układu immunologicznego w warunkach *in vitro*. Celem poniższych eksperymentów było określenie subcytotoksycznych stężeń NAC, które pozwolą w kontrolowany sposób wzbudzać sygnały niebezpieczeństwa. W badaniach użyto makrofagów izolowanych ze szpiku myszy szczepu C57BL/6 (BMDM) i komórek dendrytycznych linii JAWSII (pierwotnie izolowane z myszy szczepu C57BL/6). Komórki dendrytyczne i makrofagi odpowiadają za pobór antygeny bezpośrednio z jamy nosowej lub pośrednio z innych komórek, procesują go i przekazują dalej. Docelowo szczepionka złożona z NAC ma być stosowana donosowo, dlatego też do badań włączono trzy dostępne linie nabłonka oddechowego: dwie ludzkie linie nabłonka oddechowego (FaDu, RPMI2650) i jedna mysia linia komórek nabłonka oddechowego (TC-1, pierwotnie izolowana z myszy szczepu C57BL/6).

Założono, że poziom subcytotoksyczny NAC to taki, który powoduje śmierć co najwyżej 60% komórek w hodowli. To założenie oparto na danych literaturowych, które pokazują, że zastosowanie mieszaniny martwych i żywych komórek nabłonkowych, z których te drugie stanowią 60%, wywoływało sygnały niebezpieczeństwa w badaniach *in vitro* (ang. *danger signals*). Sygnały te mobilizowały inne komórki układu odpornościowego, np. eozynofile [272].

W trakcie wstępnych eksperymentów zbadano kilka czasów inkubacji komórek badanych linii z NAC, ale ostatecznie zdecydowano o prowadzeniu 24 godzinnej inkubacji. Po tym czasie NAC wykazywały najwyższą cytotoksyczność względem badanych linii. Jest to również czas stosowany typowo w eksperymentach dotyczących

indukcji produkcji cytokin w komórkach układu odpornościowego.

Dla większości badanych linii, stężenie subcytotoksyczne wszystkich badanych NAC wynosiło 0,01%. W przypadku badanych komórek układu immunologicznego, to jest BMDM i JAWSII, nanoadiuwant NAC13 wykazywał najwyższą cytotoksyczność. Po 24 godzinach inkubacji komórek i NAC13 najwyższym stężeniem NAC, które zabijało mniej niż 40% komórek obu badanych linii było 0,003%. Dla NAC7 i 3 to stężenie wynosiło 0,01% (**Rysunek 19A**), przy czym NAC3 wydaje się działać najsłabiej, bo zabija mniej niż 40% komórek JAWSII przy stężeniu równym 0,03%. Nie zaobserwowano podobnych zależności w przypadku komórek linii nabłonkowych (**Rysunek 19B**). Dla wszystkich trzech badanych nanoadiuwantów najwyższym stężeniem, które zabija co najwyżej 40% komórek badanej linii było 0,01% NAC.



Rysunek 19 Cytotoksyczność NAC względem komórek wybranych linii nabłonkowych i odpornościowych. Rys. 19A przedstawia wpływ NAC na przeżywalność komórek układu odpornościowego. Rys. 19B przedstawia wpływ NAC na przeżywalność komórek nabłonkowych. Komórki były inkubowane przez 24 godziny z NAC w zakresie stężeń od 0 do 0,1%. Cytotoksyczność badano za pomocą kolorymetrycznego testu SRB. Komórki nietraktowane NAC stanowią 100% żywych komórek. Każdy test powtórzono trzykrotnie. Na wykresach pokazano wynik z odchyleniem standardowym próbki. Linia na wykresie wskazuje 60% żywych komórek.

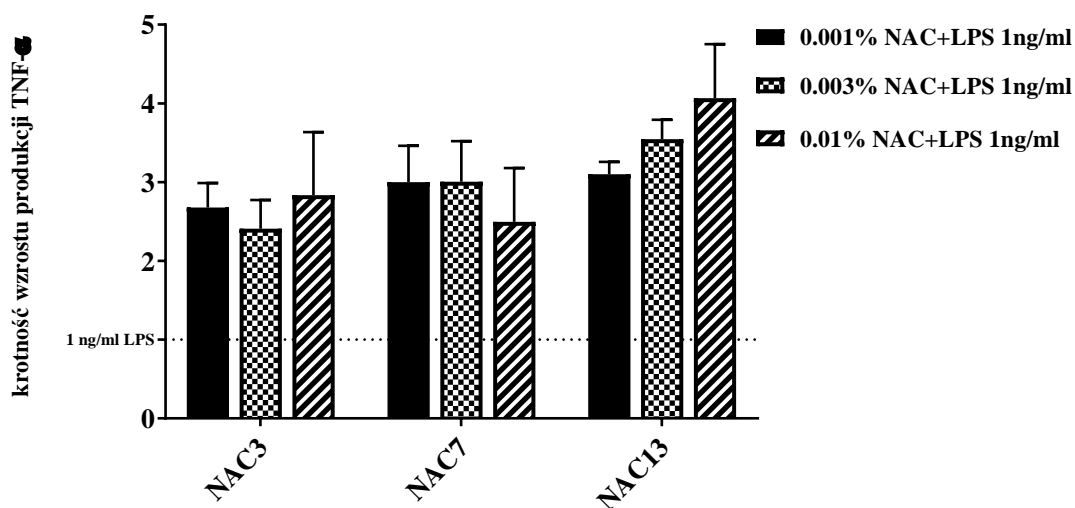
Podsumowując, poprzez zastosowanie odpowiednich stężeń nanoadiuwantów uzyskano możliwość do kontroli efektu subcytotoksycznego w postaci śmierci około 40% komórek w hodowli. Taki poziom cytotoxyczności powinien pozwolić na indukcję sygnałów niebezpieczeństwa.

7.2.7. Badanie wzmacniającego efektu NAC na wytwarzanie TNF- α przez makrofagi z wykorzystaniem suboptymalnego stężenia LPS

Niezwykle ważną cechą nanoadiuwantu jest wzmacnianie tzw. sygnałów niebezpieczeństwa, które pobudzają odpowiedź układu immunologicznego względem antygenów [273]. Do sygnałów niebezpieczeństwa uwalnianych przez zaalarmowane komórki należą: TNF α , IL-1 β , czy też składniki komórki uwalniane z uszkodzonej komórki jak np. adenozylo-5'trójfosforan, czyli główny nośnik energii w komórkach [274]. Najlepiej poznanym egzogennym sygnałem niebezpieczeństwa jest lipopolisacharyd bakteryjny.

Zbadano wpływ NAC na wytwarzanie cytokiny prozapalnej TNF- α przez makrofagi izolowane ze szpiku kostnego myszy szczepu C57BL/6 (**Rysunek 20**). Lipopolisacharyd (LPS) został użyty, jako czynnik wywołujący sygnał niebezpieczeństwa. Działa on bardzo silnie, już dawka 5 ng/ml wyzwała silną odpowiedź makrofagów w postaci wyrzutu cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 i TNF α [275]. W poniższym eksperymencie zastosowano LPS w dawce progowej (1 ng/ml) celem zaobserwowania ewentualnego efektu NAC.

Nanoadiuwanty podane bez dodatkowego immunostymulatora nie prowadzą do wytwarzania TNF- α przez makrofagi (dane nie zamieszczone). Podanie makrofagom NAC3, 7 lub 13 w połączeniu z progowym stężeniem LPS zwiększa, co najmniej trzykrotnie wytwarzanie TNF- α przez makrofagi w porównaniu do samego LPSu. NAC13 wykazuje najsilniejsze działanie wzmacniające ze wszystkich trzech badanych NAC. Warto zwrócić uwagę, że jest to ten sam nanoadiuwant, który wykazywał najsilniejsze działanie cytotoxyczne względem makrofagów.



Rysunek 20 Wpływ NAC na indukcję TNF- α . Makrofagi izolowane ze szpiku kostnego zostały poddane działaniu nanoadiuwantów i progowego stężenia LPS (1 ng/ml) przez 24 godziny. Eksperyment powtórzono czterokrotnie, na wykresie przedstawiono uśrednione wyniki z wyliczonym błędem standardowym średniej (SEM).

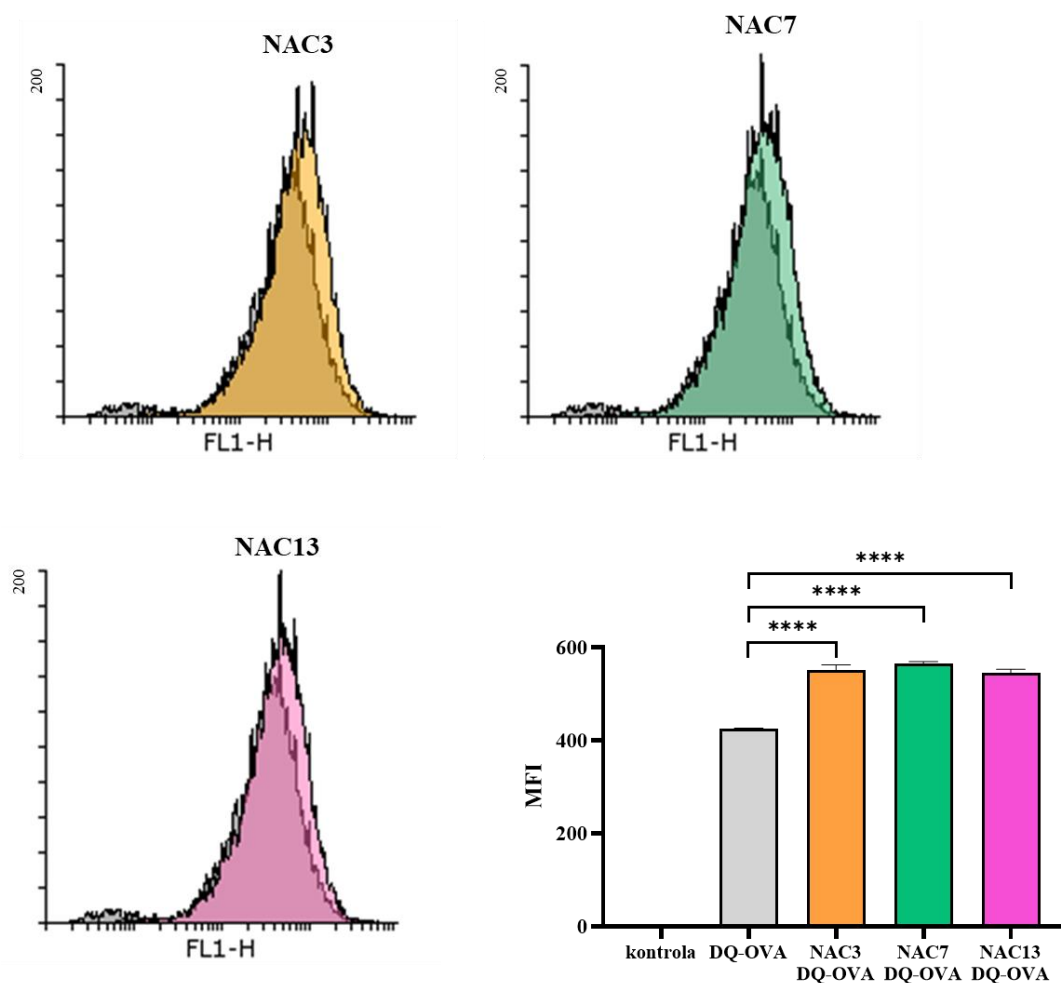
Podsumowując, nanoadiuwanty wzmacniają odpowiedź na podane progowe ilości LPS. Efekt ten może wynikać ze zmian w płynności błony komórek, a co za tym idzie sprawniejszym poborem antygeny albo też NAC mogą wzmacniać ekspresję receptorów błonowych rozpoznających LPS.

7.2.8. Wpływ NAC na pobieranie antygeny przez komórki immunokompetentne

Transport antygenów przez barierę nabłonkową nosa jest pierwszym etapem wywołania odpowiedzi odpornościowej organizmu i może zachodzić z udziałem komórek nabłonka albo komórek dendrytycznych. Wejście patogenów lub ich antygenów, w głąb nabłonka jest zależny od wielu czynników, a w szczególności od oddziaływania powierzchni śluzówki i obecnych na niej receptorów z wprowadzanymi związkami.

Analizowano wpływ NAC na pobieranie antygeny przez mysie komórki dendrytyczne i komórki nabłonka oddechowego, z wykorzystaniem DQ-OVA jako modelowego antygeny. Jest to substrat dla proteaz, po którego obróbce uwalnia się fluorescencyjny produkt. Średnia intensywność fluorescencji (MFI) jest wskaźnikiem ilości pobranego i potrawionego białka przez komórki.

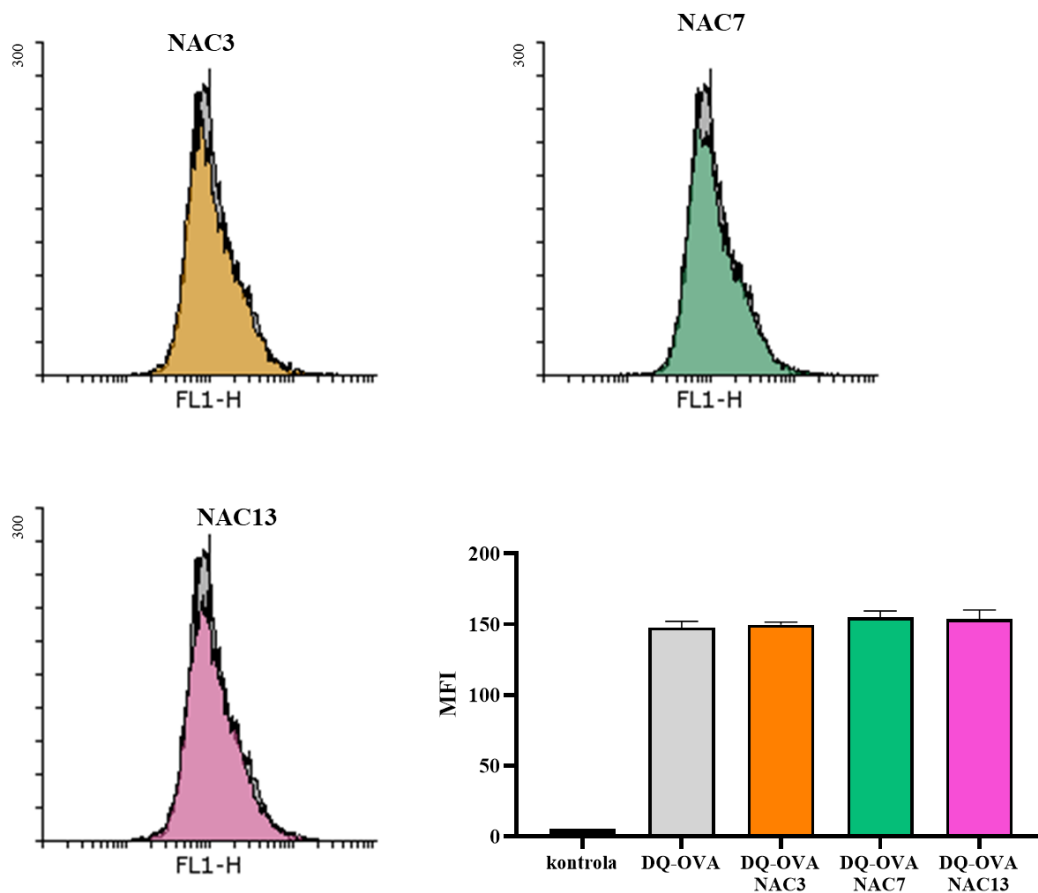
W przypadku komórek dendrytycznych linii JAWSII dodatek 0,03% NAC3, 7 lub 13 wpływał korzystnie na proces pobierania DQ-OVA przez traktowane nimi komórki (**Rysunek 21**). Inkubacja komórek z DQ-OVA trwała 4 godziny i została przeprowadzona w temperaturze 37 °C. Czas inkubacji dobrano na podstawie badań wstępnych. Nanoadiuwanty NAC3 i 7 wykazywały nieznacznie silniejszy wpływ na pobieranie DQ-OVA niż NAC13.



Rysunek 21 Wpływ 0,03% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki dendrytyczne. Komórki linii JAWSII inkubowano z 0,03% NAC przez 4 h. Po odmyciu wolnego DQ-OVA komórki analizowano cytofluorymetrycznie. Wyniki pomiaru fluorescencji dla poszczególnych NAC pokazano za pomocą histogramów. Zebrano wyniki średniej fluorescencji na wykresie i analizowano testem ANOVA ($p < 0,05$). Wyniki reprezentatywne dla dwóch powtórzeń. Kontrolę stanowią komórki nietraktowane.

W przypadku komórek nabłonka oddechowego linii TC-1 dodatek

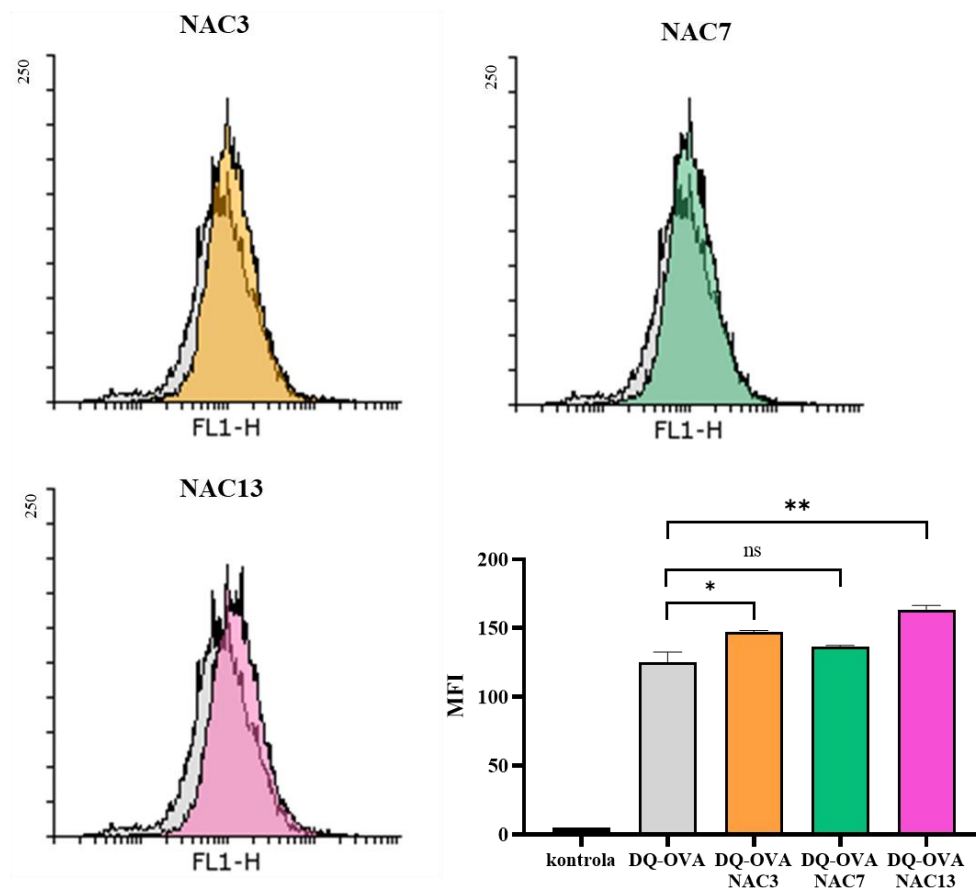
nanoadiuwantów w stężeniu równym 0,03% nie wpływał znacząco na proces pochłaniania antygeny.



Rysunek 22 Wpływ 0,03% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki nabłonkowe.

Komórki linii TC-1 inkubowano z 0,03% NAC przez 12 godzin. Po odmyciu wolnego DQ-OVA komórki analizowano cytofluorometrycznie. Wyniki pomiaru fluorescencji dla poszczególnych NAC pokazano za pomocą histogramów. Zebrano wyniki średniej fluorescencji na wykresie i analizowano testem ANOVA ($p < 0,05$). Wyniki reprezentatywne dla dwóch powtórzeń. Kontrolę stanowią komórki nietraktowane.

Na podstawie badań cytotoksyczności wysunięto wniosek, że komórki nabłonka (linii TC-1) są bardziej odporne na działanie NAC niż komórki dendrytyczne. Można to wyjaśnić tym, że w warunkach biologicznych komórki nabłonka jako pierwsza linia obrony, powinny wykazywać wyższą wytrzymałość na niekorzystne warunki niż komórki znajdujące się w głębszych warstwach śluzówki. Zbadano wpływ 0,06% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki nabłonka linii TC-1 (**Rysunek 23**). NAC3 i NAC13 wspomagały pobór antygeny w postaci DQ-OVA, gdy podane zostały w stężeniu 0,06%.



Rysunek 23 Wpływ 0,06% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki nabłonkowe.

Komórki linii TC-1 inkubowano z 0,06% NAC przez 12 godzin. Po odmyciu wolnego DQ-OVA komórki analizowano cytofluorometrycznie. Wyniki pomiaru fluorescencji dla poszczególnych NAC pokazano za pomocą histogramów. Zebrano wyniki średniej fluorescencji na wykresie i analizowano testem ANOVA ($p < 0,05$). Wyniki reprezentatywne dla dwóch powtórzeń. Kontrolę stanowią komórki nietraktowane.

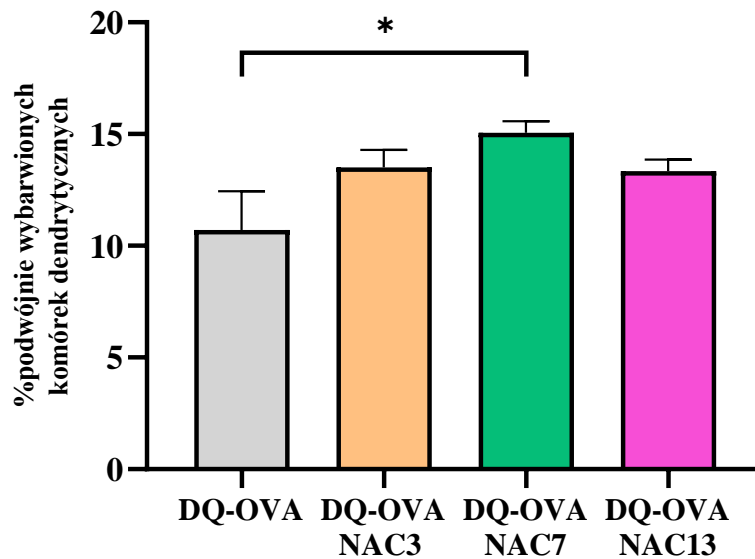
Podsumowując, nanoadiuwanty podane komórkom immunokompetentnym w stężeniu 0,03% indukują pochłanianie DQ-OVA przez komórki dendrytyczne. Nie zaobserwowano takiego samego efektu, gdy podano DQ-OVA wraz 0,03% NAC komórkom nabłonka oddechowego. Wzrost ilości pochłoniętego antygeny w stosunku do próbek, gdzie nie dodano NAC, uzyskano w przypadku zastosowania wyższego stężenia NAC (0,06%).

7.2.9. Wpływ NAC na przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami immunokompetentnymi

Komórki nabłonka oddechowego tworzą zwartą barierę chroniącą wnętrze organizmu przed niebezpiecznymi dla niego cząsteczkami i patogenami. Kolejną funkcją nabłonka, pełnioną we współpracy z komórkami dendrytycznymi, jest pobór antygenów/cząsteczek ze światła układu oddechowego. Następnie, układ odpornościowy „bada” czy jest to związek względem, którego należy się mobilizować, czy też wbudzić tolerancję. Istotnym czynnikiem wpływającym na proces pobierania próbek jest ich przekazywanie pomiędzy różnymi rodzajami komórek układu odpornościowego celem wzbudzenia względem niego adekwatnej odpowiedzi. Adiuwant, który wpływa pozytywnie na ten proces, jest szczególnie przydatny jako składnik szczepionek dośluzówkowych.

Zbadano jak dodatek NAC wpływa na przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami układu odpornościowego (**Rysunek 24**). Komórki nabłonka oddechowego linii TC-1 inkubowano przez noc w 37 °C z DQ-OVA z dodatkiem albo bez dodatku 0,01% NAC3, 7 lub 13. Następnego dnia, po odpłukaniu pozostałości NAC i DQ-OVA, dodano do nich komórki dendrytyczne linii JAWSII wybarwione PKH-26, w stosunku 2:1 (dwa razy więcej komórek nabłonkowych niż dendrytycznych). Po 4 godzinach wspólnej inkubacji komórek nabłonkowych i dendrytycznych w 37 °C, komórki zebrano i analizowano za pomocą cytofluorometru. Komórki podwójnie wybarwione to komórki dendrytyczne (barwione PKH-26), które przejęły antygen od komórek nabłonkowych (DQ-OVA).

Inkubacja komórek dendrytycznych z DQ-OVA w 0,01% NAC powodowała większe przekazywanie DQ-OVA komórkom dendrytycznym, jednakże (**Rysunek 24**) wzrost ten był istotny statystycznie jedynie w przypadku NAC7 (ANOVA, $p < 0,05$).



Rysunek 24 Wpływ 0,01% NAC na przekazywanie białka pomiędzy komórkami nabłonkowymi, a dendrytycznymi. Komórki nabłonkowe linii TC-1 inkubowano przez noc z DQ-OVA z lub bez 0,01% NAC, a następnie po odmyciu wolnego białka komórki nabłonka inkubowano z wybarwionymi PKH-26 komórkami dendrytycznymi. Dane z dwóch powtórzeń, analizowane testem ANOVA ($p < 0,05$).

Podsumowując, nanoadiuwanty mogą wpływać na przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami układu odpornościowego. Efekt ten może wynikać z indukcji apoptozy u komórek nabłonkowych przez co te są lepiej rozpoznawane przez komórki żerne.

7.2.10. Badanie toksyczności NAC w eksperymencie *in vivo*

Obecność adiuwantów w szczepionkach może prowadzić do występowania dodatkowych skutków ubocznych, takich jak: ból w miejscu podania, opuchlizna, czy pogorszenie ogólnego samopoczucia [88]. Zbadano, jak podanie donosowo i domięśniowo NAC, jest tolerowane przez badane myszy.

Do wszystkich eksperymentów *in vivo* wybrano szczep myszy C57BL/6, ponieważ jest to szczep myszy użyty w modelu zakażenia CD [276], a na którym docelowo będą badane właściwości ochronne koniugatów epitopów CD z białkiem nośnikowym w NAC. Dobór maksymalnej dawki NAC oparto o dostępną literaturę dotyczącą adiuwantów emulsyjnych [122].

Podano jednorazowo NAC3, 7 i 13 myszom w maksymalnych dawkach (20% dla

podania donosowego i 2,5% dla podania domięśniowego). Następnie, myszy obserwowano przez siedem kolejnych dni pod kątem pojawiających się oznak dystresu, takie jak obniżona aktywność, najeżona sierść, utrata wagi, biegunka, odwodnienie oraz objawów zapalenia okolicy oczu, uszu i nosa [277]. Myszy zostały zważone przed podaniem NAC i po siedmiu dniach obserwacji. Badano miejsce podania NA pod kątem ewentualnej opuchlizny.

Wszystkie myszy, którym podano NAC przeżyły eksperyment ($n = 40$). Przez cały okres obserwacji (7 dni) nie zanotowano żadnych oznak dystresu. Nie zaobserwowano opuchlizny w miejscu podania NAC. Wykazano brak istotnych zmian w masie myszy we wszystkich badanych grupach porównując masę przed szczepieniem i po szczepieniu myszy (**Tabela 17**).

Tabela 17 Wynik pomiaru mas myszy, którym podano NAC. Osiem grup myszy C57BL/6 zostały zaszczepione donosowo i domięśniowo NAC ($n = 5$). Myszy zważono przed podaniem NAC i po siedmiu dniach obserwacji. Dane analizowano za pomocą testu t porównując średnie uzyskane dla poszczególnych grup przed i po szczepieniu ($p < 0,05$).

Podanie donosowe			
	Masa ciała [g] t_0	Masa ciała [g] t_7	wartość p
NAC3	16,86 ± 0,91	17,18 ± 1,1	0,626269
NAC7	19,24 ± 0,96	19,6 ± 0,92	0,583977
NAC13	17,28 ± 0,75	17,5 ± 0,87	0,737525
PBS	16,46 ± 1,13	16,88 ± 1,44	0,523275
Podanie domięśniowe			
	Masa ciała [g] t_0	Masa ciała [g] t_7	wartość p
NAC3	17,38 ± 0,27	17,56 ± 0,15	0,718425
NAC7	18,86 ± 1,06	19,62 ± 1,07	0,134392
NAC13	17,78 ± 0,74	17,6 ± 0,72	0,718425
PBS	17,32 ± 0,67	17,06 ± 1,01	0,602899

Podsumowując, nanoadiuwanty są nieszkodliwe dla myszy w dawce 20% w podaniu donosowym oraz 2,5% w podaniu domięśniowym.

7.2.11. Podsumowanie danych otrzymanych dla NAC3, 7 i 13

NAC3, 7 i 13 są stabilne przez co najmniej rok, wykazują bioadhezję, oddziałują z modelowym antygenem i trwale go wiążą, nie wpływają również negatywnie na jego integralność. Warto wspomnieć, że NAC3, 7 i 13 różnią się między sobą, a w **Tabeli 18** przedstawiono podsumowanie tych różnic. Na podstawie danych zebranych w **Tabeli 18** można stwierdzić, że nanoadiuwanty o najbardziej skrajnych właściwościach to NAC3 i NAC13. NAC7 wykazuje właściwości pośrednie. Przykładowo, krople NAC3 mają najniższy potencjał zeta (30,4 mV), a krople NAC13 najwyższy (64,4 mV). NAC3 wyjawuje najslabsze działanie cytotoksyczne względem JAWS i TC-1, a NAC13 najsilniejsze. NAC3 wykazuje najslabszy wpływ na produkcję TNF α przez makrofagi podczas indukcji progowymi stężeniami LPSu, a NAC13 najsilniejszy.

Tabela 18 Właściwości fizykochemiczne i biologiczne NAC3, 7 i 13. W tabeli zebrano wyniki badań dotyczących właściwości fizykochemicznych i biologicznych NAC. Dla wyników dotyczących cytotoksyczności podano najwyższe stężenie NAC, które zabija mniej niż 40% komórek. +++ - silne pozytywne działanie, ++ - średnie pozytywne działanie, + - słabe pozytywne działanie.

		NAC3	NAC7	NAC13
Skład		olej silikonowy, tyloxapol, aceton, BDMDDAC	olej silikonowy, tyloxapol, etanol, BDMDDAC	olej silikonowy, tyloxapol, etanol, CBP
Badana właściwość		NAC3	NAC7	NAC13
Wielkość kropeł		534 nm	405,5 nm	623,6 nm
Potencjał zeta kropeł		30,4 mV	31,6 mV	64,4 mV
Oddziaływanie z mucyną	Δ wielkości	-45 nm	-4,2 nm	+25,7 nm
	Δ ZP	-56,5 mV	-56,9 mV	-80,8 mV
Oddziaływanie z OVA	Δ wielkości	+3428 nm	+6939,5 nm	+7768,4 nm
	Δ ZP	-0,4 mV	-21,8 mV	-25,1 mV
Trwałość oddziaływania z OVA		100%	100%	98%
Wpływ na integralność OVA		++	+++	++
Wpływ sterylizacji	Δ wielkości	bez zmian	bez zmian	bez zmian
	Δ ZP	Obniżenie	Obniżenie	bez zmian
Cytotoksyczność <40% BMDM		0,01%	0,01%	0,01%
Cytotoksyczność <40% JAWS		0,03%	0,01%	0,003%
Cytotoksyczność <40% TC-1		0,03%	0,03%	0,01%
Cytotoksyczność <40% FaDu		0,01%	0,01%	0,01%
Cytotoksyczność <40% RPMI		0,01%	0,01%	0,01%
Krotność wzrostu produkcji TNFα dla stężenia NAC 0,003%		2,41	3	3,545
Wpływ na pochłanianie DQ-OVA przez komórki dendrytyczne		+++	+++	++
Wpływ na przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami nabłonka, a dendrytycznymi			+	

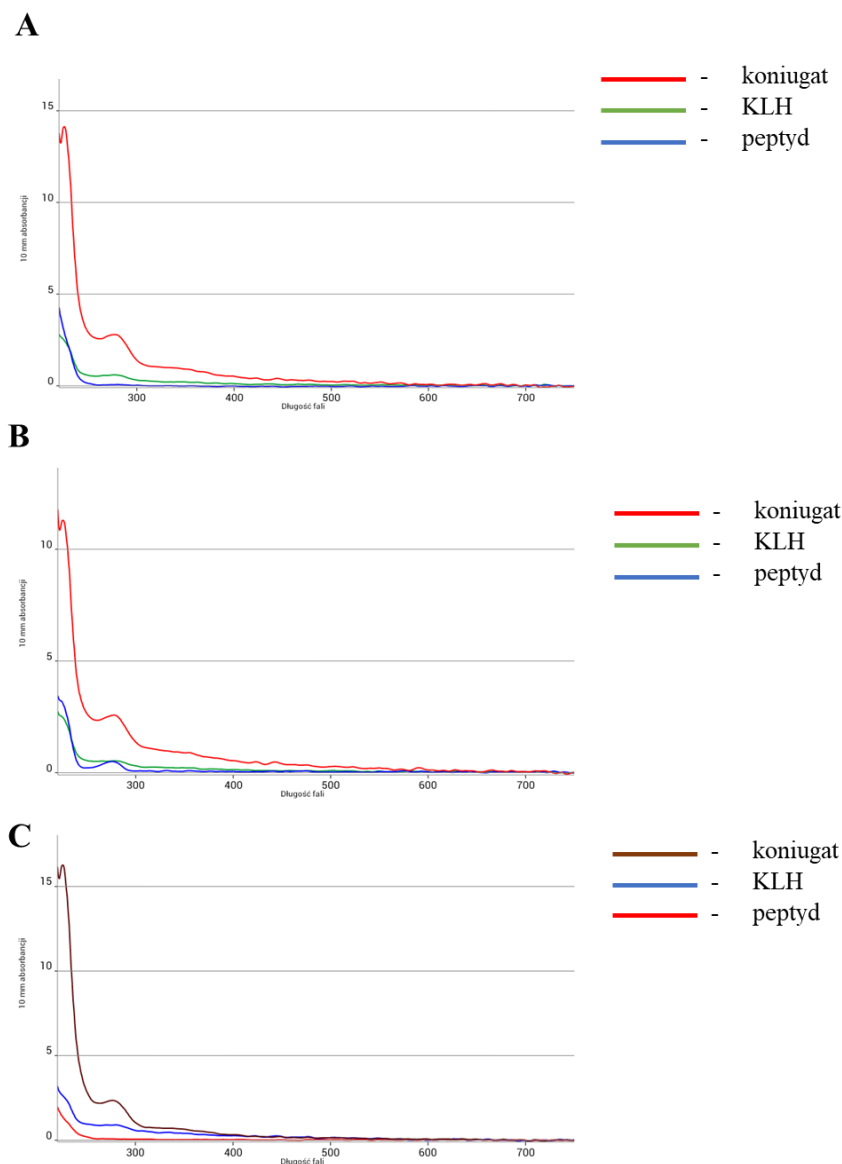
7.3. Badanie właściwości protoszczepionki złożonej z koniugatów epitopów CD z białkiem nośnikowym zawieszonych w NAC

W badaniach *in vivo* dotyczących właściwości adiuwantowych NAC zastosowano peptydy o najwyższej immunoreaktywności (Rozdział 7.1.4): dwa peptydy białka Cwp22 [nr 3 (ATGKKGSETPTGKTKV) i 4 (VNKIKNRPYYKGNIPG)] zawierające minimalne epitopy oraz jeden peptyd białka M24 (KKGIK) otrzymany przez mgr. Katarzynę Pacygę w ramach jej pracy magisterskiej.

Peptydy zostały zawieszony w trzech wybranych NAC (NAC3, 7 i 13), które posiadały najlepsze właściwości adiuwantowe scharakteryzowane w badaniach nad właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi (**Tabela 18**)

7.3.1. Charakterystyka koniugatów użytych w protoszczepionce

Peptydy 3 i 4 białka Cwp22 oraz epitop białka M24 (KKGIK) poddano koniugacji z KLH w wyniku czego otrzymano kolejno koniugaty K1 (ATGKKGSETPTGKTKVC-KLH) i K2 (VNKIKNRPYYKGNIPGC-KLH) i K3 (KKGIKC-KLH). Koniugaty analizowano z użyciem metody pomiaru absorbancji światła w zakresie 190-400 nm (**Rysunek 25**) [242].



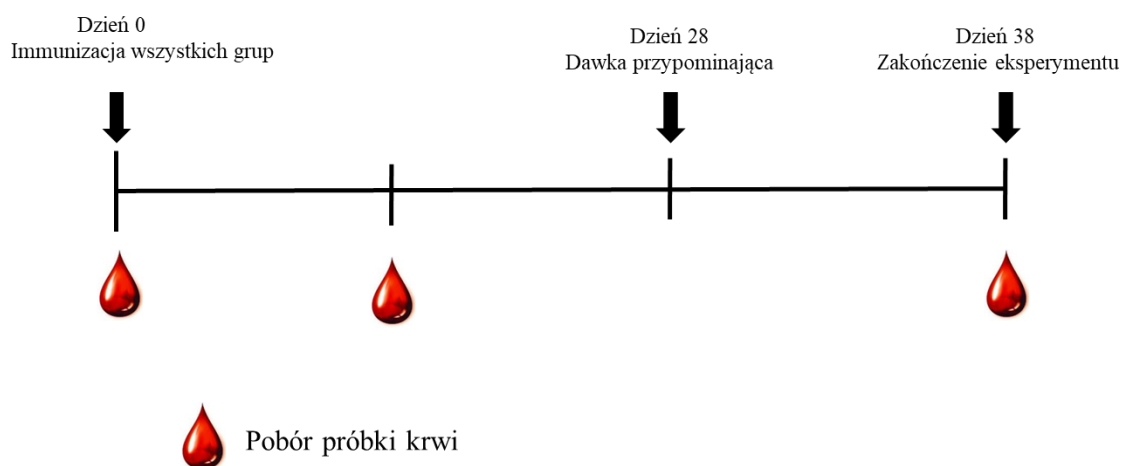
Rysunek 25 Analiza spektrofotometryczna koniugatów. Peptydy, KLH oraz koniugaty peptydu i KLH mierzono w buforze do elucji koniugatów z kolumny. Rys. 25A prezentuje widmo koniugatu K1 (ATGKKGSETPTGKTKVC-KLH), peptydu ATGKKGSETPTGKTKVC i KLH. Rys. 25B prezentuje widmo koniugatu K2 (VNKIKNRPYYKGNIPGC-KLH), peptydu VNKIKNRPYYKGNIPGC i KLH. Rys. 25C prezentuje widmo koniugatu K3 (KKGIKC-KLH), peptydu KKGIKC i KLH.

Analiza widm absorbancji światła w zakresie 190-400 nm wykazuje istotne różnice zarówno w intensywności absorbancji jak i długości światła, przy której występuje maksimum absorbancji badanych substancji. Wszystkie badane substancje zostały rozpuszczone w tym samym buforze i w tym samym stężeniu (1 mg/ml). Dlatego różnice widoczne na **Rysunku 25** wynikają jedynie z różnych właściwości spektralnych

badanych substancji. Potwierdza to, że koniugacja przebiegła pomyślnie i otrzymano koniugaty K1 (ATGKKGSETPTGKTKVC-KLH), K2 (VNKIKNRPYKGNIPGC-KLH) i K3 (KKGKIC-KLH). Analiza widm absorbancji światła w zakresie 190-400 nm nie pozwala jednak na określenie poziomu podstawienia cząsteczek KLH dodanymi peptydami.

7.3.2. Właściwości immunogenne protoszczepionki.

Właściwości immunogenne protoszczepionki złożonej z zestawu koniugatów (K1, K2, K3) i jednego z trzech nanoadiuwantów (NAC3, 7 lub 13) badano w eksperymencie *in vivo* z użyciem myszy szczepu C57BL/6. Myszy ($n = 40$, po 5 na grupę) podzielono na 8 grup. Cztery grupy myszy zaszczepiono donosowo, protoszczepionką złożoną z 10% NAC i trzech koniugatów (po 7 μg każdego/mysz) (grupy: **NAC3** K1, K2, K3; **NAC7** K1, K2, K3; **NAC13** K1, K2, K3) oraz PBS. Cztery kolejne grupy zostały zaszczepione domięśniowo 100 μl protoszczepionki, w której skład wchodziły trzy koniugaty (po 7 μg każdego/mysz) zawieszony w 2,5% NAC lub w 0,5 mg/ml alum oraz PBS (grupy: **NAC3** K1, K2, K3; **NAC13** K1, K2, K3; **alum** K1, K2, K3; PBS). Myszy szczepiono dwukrotnie w odstępie dwóch tygodni. Myszy zważono przed rozpoczęciem i po zakończeniu eksperymentu. Pobrano krew na początku eksperymentu, po 14 dniach i po zakończeniu eksperymentu (dzień 38). W dniu zakończenia eksperymentu pobrano myszom śledziony. Myszy poddawane były obserwacji przez cały okres trwania eksperymentu.



Rysunek 26 Schemat eksperymentu in vivo. Myszy podzielono na 8 grup ($n = 5$). Cztery grupy zostały zaszczepione donosowo (NAC3 K1, K2, K3; NAC7 K1, K2, K3; NAC13 K1, K2, K3; PBS), a pozostałe cztery (NAC3 K1, K2, K3; NAC13 K1, K2, K3; alum K1, K2, K3; PBS) zostały zaszczepione domięśniowo. Szczepienie powtórzono po dwóch tygodniach. Na schemacie zaznaczono kiedy zostały pobrane próbki krwi.

Zmniejszanie wagi myszy w trakcie eksperymentu wskazuje na pogarszający się stan zdrowia zwierzęcia. Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w średniej wadze grup myszy szczepionych protoszczepionkami (**Tabela 19**) porównując je do grup kontrolnych, którym podawano PBS. Oznacza to, że protoszczepionka jest dobrze tolerowana. Co więcej, nie zanotowano zmian w zachowaniu myszy ani innych oznak dystresu. Badanie wizualne i palpacyjne miejsca aplikacji protoszczepionki (nos, mięsień czterogłowy) nie wykazały opuchlizny, czy zaczerwienienia. Jedna mysz padła w trakcie eksperymentu (grupa 2, NAC13 + K1, K2, K3 podane donosowo), jednakże sekcja wykonana przez lekarza weterynarii nie potwierdziła związku śmierci myszy z przeprowadzonym eksperymentem.

Tabela 19 Badanie masy ciała szczepionych myszy. Myszy były ważone na początku eksperymentu i po jego zakończeniu. (test t, $p < 0,05$).

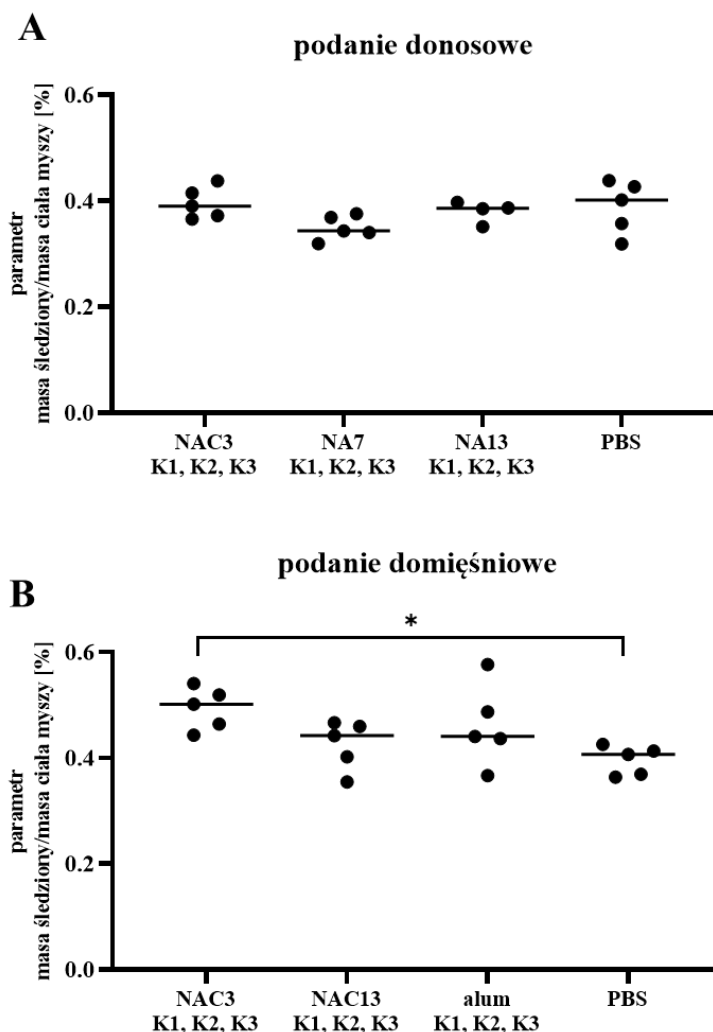
Podanie donosowe			
	Masa ciała [g] t_0	Masa ciała [g] t_{38}	wartość p
NAC3 K1, K2, K3	19,48 ± 2,05	21,36 ± 1,16	0,6872
NAC7 K1, K2, K3	19,42 ± 0,46	20,64 ± 1,8	0,9985
NAC13 K1, K2, K3	18,8 ± 1,56	20,85 ± 0,59	0,9760
PBS	18,3 ± 0,86	20,52 ± 1	
Podanie domięśniowe			
	Masa ciała [g] t_0	Masa ciała [g] t_{38}	wartość p
NAC3 K1, K2, K3	18,78 ± 0,59	21,72 ± 0,81	0,9994
NAC13 K1, K2, K3	18,58 ± 0,81	20,68 ± 0,37	0,2897
Alum K1, K2, K3	18,42 ± 0,83	21,28 ± 1,95	0,8760
PBS	19,54 ± 0,71	21,66 ± 1,03	

Podsumowując, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w średnich masach ciała myszy grup szczepionych koniugatami w NAC lub alum względem odpowiednich grup kontrolnych, którym podano PBS. Nie zaobserwowano innych oznak dystresu w trakcie przeprowadzania eksperymentu.

Wyliczenie stosunku masy śledziony do masy myszy jest pomocne w określaniu odpowiedzi na podaną szczepionkę. Uważa się, że ten parametr określa akumulację komórek układu odpornościowego w śledzionie oraz wskazuje na obecność stanu zapalnego w organizmie [278]. Zbadano, jak szczepienie myszy protoszczepionkami zawierającymi NAC i koniugaty białek CD, wpływają na masę śledziony (**Rysunek 27**). W tym celu wyliczono stosunek masy śledziony do masy ciała myszy i porównano wynik uzyskany dla grup badanych z wynikiem uzyskanym dla grupy kontrolnej.

Nie wykazano istotnego statystycznie wzrostu parametru masy śledziony do masy ciała myszy w przypadku grup szczepionych donosowo (**Rysunek 27A**). W przypadku szczepienia domięśniowego, jedynie dla grupy szczepionej protoszczepionką złożoną

z NAC3 i K1, K2, K3 wykazano istotny wzrost parametru obciążenia śledziony (Rysunek 27B).

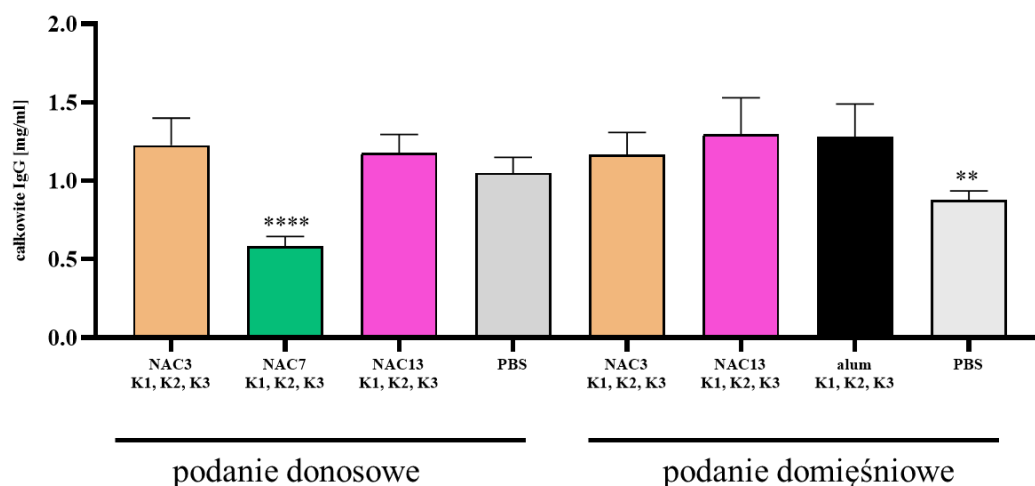


Rysunek 27 Stosunek masy śledziony do masy ciała obliczony dla szczepionych myszy. Myszy zostały zważone po zakończonym eksperymencie, tak jak i wyizolowane z nich śledziony. Następnie podzielono masę śledziony przez masę myszy i przemnożono x100. Rys. 27A prezentuje parametr masy śledziony do masy myszy wyliczony dla myszy z grupy szczepionej donosowo. Rys. 27B prezentuje parametr masy śledziony do masy myszy wyliczony dla myszy z grupy szczepionej domięśniowo. Dane analizowano za pomocą testu ANOVA ($p < 0,05$).

Podsumowując, protoszczepionka zawierająca NAC3 i zestaw koniugatów w podaniu domięśniowym istotnie zmienia parametr obciążenia śledziony. Podwyższenie tego parametru w przypadku grupy szczepionej NAC3 mogłoby wskazywać na większą efektywność tego szczepienia.

Badanie poziomu wszystkich przeciwciał IgG obecnych w surowicy krwi myszy jest dobrym wskaźnikiem systemowej odpowiedzi odpornościowej organizmu na szczepienie. Zbadano poziom wszystkich przeciwciał IgG w surowicy myszy dwukrotnie szczepionych protoszczepionką i porównano je z poziomami uzyskanymi dla formułacji zawierającej alum z tym samym zestawem koniugatów (K1, K2 i K3) (**Rysunek 28**). Oznaczenie wykonano z użyciem surowic otrzymanych po skrwawieniu myszy w ostatnim dniu eksperymentu (dzień 38).

Poziom wszystkich przeciwciał IgG w surowicy myszy szczepionych donosowo protoszczepionką zawierającą NAC jest porównywalny do tego, który uzyskano dla grupy szczepionej domięśniowo formułacją zawierającą w swoim składzie alum. Wyjątek stanowi NAC7, w przypadku tego nanoadiuwantu odnotowano znaczne obniżenie poziomu wszystkich przeciwciał IgG po szczepieniu protoszczepionką złożoną z NAC7 i koniugatów K1, K2 i K3. Obniżenie poziomu przeciwciał IgG wywołane przez podanie NAC7 jest również istotne statystycznie względem grupy kontrolnej szczepionej donosowo PBSem ($p = 0,0012$). W przypadku protoszczepionki zawierającej NAC, ale podanej domięśniowo, poziomy wszystkich przeciwciał IgG również nie są istotnie statystycznie różne od poziomu tych przeciwciał oznaczonego dla grupy szczepionej formułacją z alum i zestawem koniugatów.

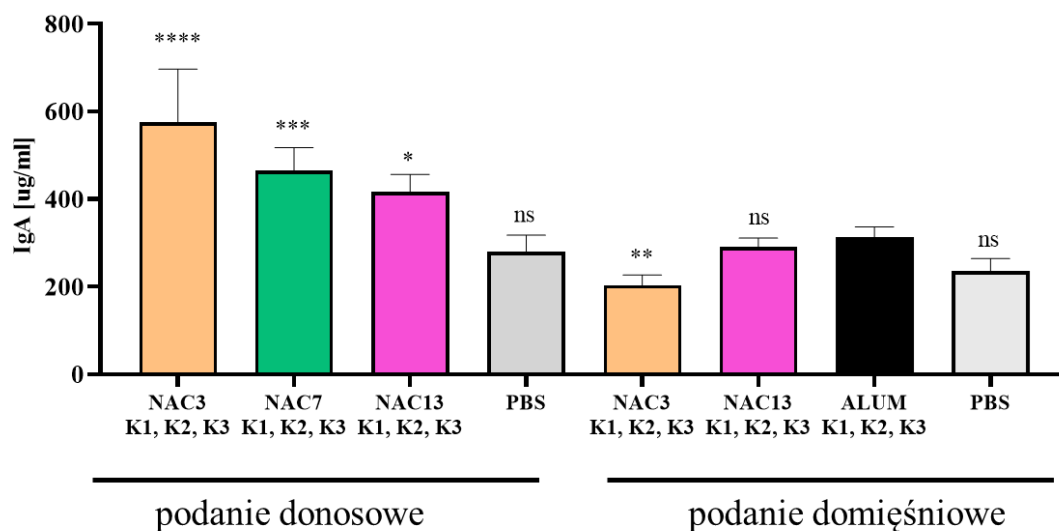


Rysunek 28 Poziom wszystkich przeciwciał IgG w surowicy szczepionych myszy. Poziom całkowitych przeciwciał IgG został zbadany za pomocą ELISA. Oznaczenie powtórzono trzykrotnie. Na wykresie średnia z odchyleniem standardowym. Dane analizowano za pomocą testu ANOVA ($p < 0,05$). Wszystkie grupy porównano z wynikiem otrzymanym dla grupy alum K2, K3, K4.

Podsumowując, poziom wszystkich przeciwciał IgG oznaczony w surowicy badanych myszy jest podobny u grup szczepionych koniugatami w NAC3, 13 i alum w przypadku obu dróg podania. Zaobserwowano interesujący efekt supresji poziomu całkowitych przeciwciał IgG w przypadku szczepienia myszy koniugatem w NAC7.

Zbadano, jak podanie protoszczepionki zawierającej NAC, wpływa na poziom całkowitych przeciwciał IgA w surowicy krwi szczepionych myszy (**Rysunek 29**). Podejście to wynika z tego, że opisano wyższy poziom przeciwciał anti-CD typu IgA w surowicy krwi bezobjawowych nosicieli niż u pacjentów w trakcie CDI [190]. Również w przypadku innych zakażeń postuluje się właściwości ochronne przeciwciał IgA krążących we krwi [279–281]. Uważa się, że krążące we krwi przeciwciała IgA mogą służyć jako przeciwciała „rezerwowe” na wypadek ogólnoustrojowej infekcji wywołanej przez patogen atakujący śluzówkę [282].

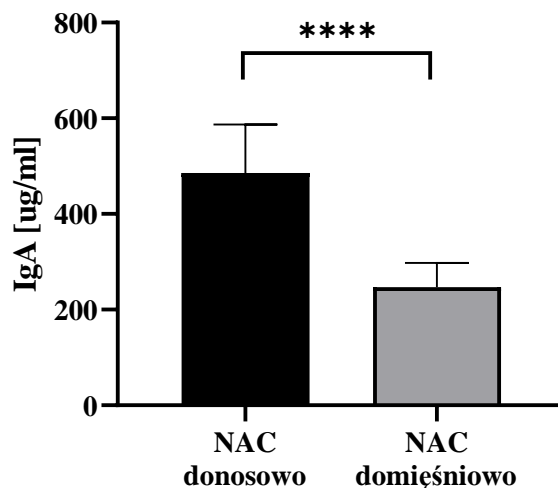
Oznaczono poziom wszystkich przeciwciał IgA w surowicach krwi badanych myszy pobranych w ostatnim dniu eksperymentu (dzień 38). Wyniki dla wszystkich grup porównano z wynikiem otrzymanym dla grupy szczepionej domięśniowo koniugatami w alum. Poziom wszystkich przeciwciał IgA był istotnie statystycznie wyższy w przypadku grup, którym podano donosowo protoszczepionki zawierające NAC z zestawem koniugatów niż w przypadku szczepienia koniugatami z alum (**Rysunek 29**). Poziom przeciwciał całkowitych IgA w surowicy myszy szczepionych domięśniowo protoszczepionkami zawierającymi NAC był porównywalny z poziomem przeciwciał IgA oznaczonych dla grupy szczepionej protoszczepionką z alum i zestawem koniugatów.



Rysunek 29 Poziom całkowitych IgA w surowicy szczepionych myszy. Poziom całkowitych przeciwciał IgA został zbadany za pomocą ELISA. Oznaczenie powtórzono trzykrotnie. Na wykresie średnia z odchyleniem standardowym. Dane analizowano za pomocą testu ANOVA ($p < 0,05$). Wszystkie grupy porównano z wynikiem otrzymanym dla grupy alum K2, K3, K4.

Podsumowując, nanoadiuwanty podane wraz z antygenem donosowo wbudzają odpowiedź w postaci surowicznych przeciwciał IgA. Poziom ten jest znacznie wyższy niż w przypadku protoszczepionki zawierającej te same koniugaty, ale w której jako adiuwant zastosowano alum.

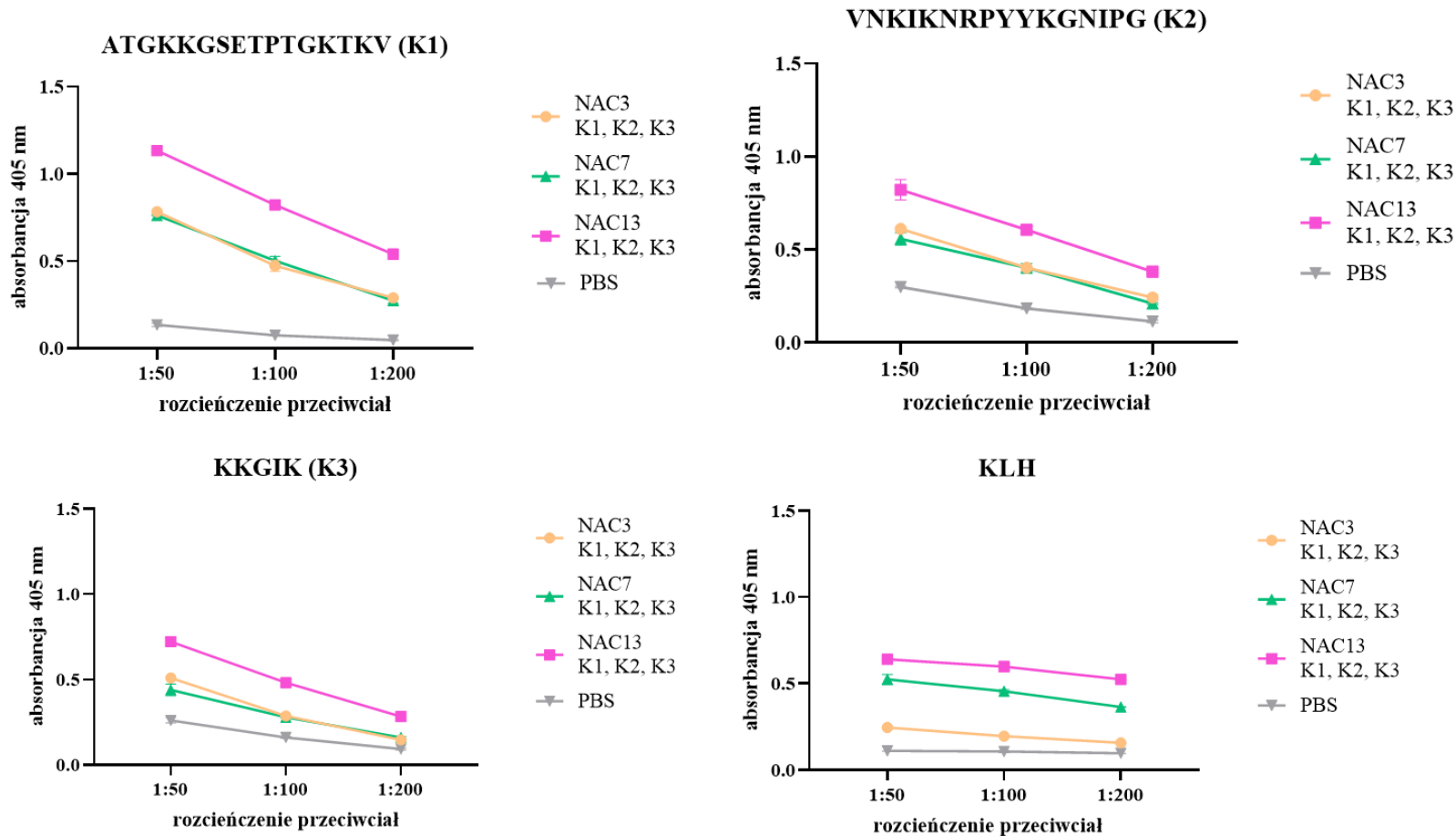
Porównano poziomy przeciwciał IgA w surowicy myszy szczepionych protoszczepionką zawierającą te same koniugaty i NAC ale dwoma różnymi drogami (**Rysunek 30**). Protoszczepionka zawierająca w swoim składzie NAC podana donosowo indukuje więcej przeciwciał IgA niż ta podana domięśniowo.



Rysunek 30 Porównanie średnich poziomów przeciwciał IgA w surowicy krwi myszy szczepionych protoszczepionkami zawierającymi NAC i koniugaty dla dwóch dróg podania. Na wykresie przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Dane analizowane testem ANOVA ($p < 0,05$).

Zbadano odpowiedź humoralną IgG u szczepionych myszy na koniugaty zawarte w szczepionce oraz osobno na KLH. Test immunoenzymatyczny przeprowadzono z użyciem płytek opłaszczonych pojedynczymi koniugatami oraz płytką opłaszczoną wyłącznie KLH. Odjęto wynik uzyskany dla KLH od wyników otrzymanych dla koniugatów celem określenia specyficznej odpowiedzi względem zastosowanych w koniugatach peptydów.

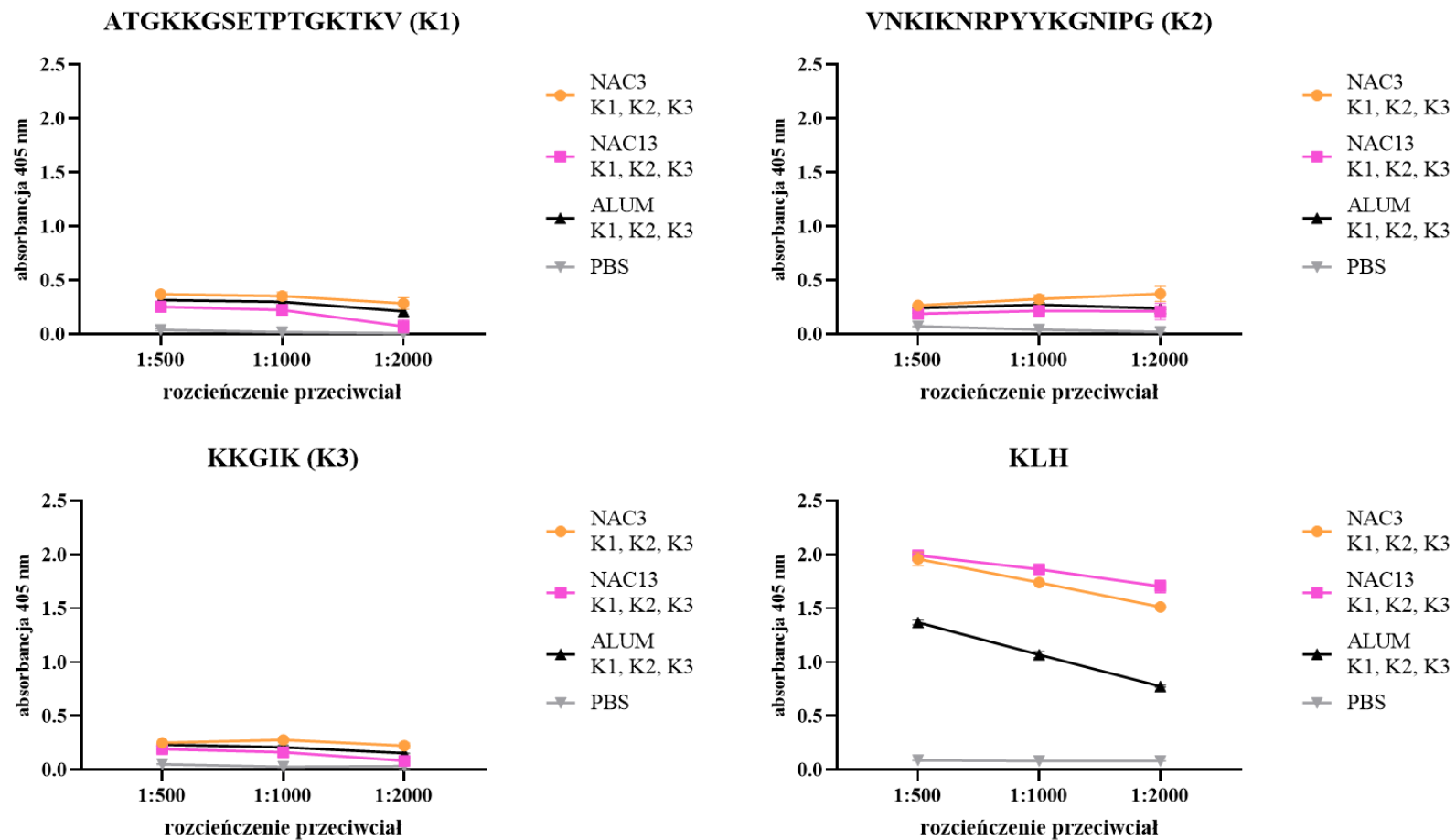
Podanie donosowe koniugatów w NAC skutkowało otrzymaniem specyficznych przeciwciał IgG względem zastosowanych w koniugatach peptydów (**Rysunek 31**). Najwyższą efektywność szczepienia uzyskano dla protoszczepionki zawierającej koniugaty zawieszane w NAC13. W przypadku wszystkich trzech koniugatów szczepienie protoszczepionką zawierającą NAC3 i 7 dało podobny rezultat. Odnotowano również odpowiedź na białko nośnikowe, była ona jednak porównywalna lub nawet niższa niż ta oznaczona dla koniugatów. Najsilniej immunizuje koniugat K1.



Rysunek 31 Poziomy specyficznych przeciwciał IgG względem sekwencji peptydowych będącymi składnikami koniugatów zastosowanych w protoszczepionkach podanych donosowo. Test immunoenzymatyczny został przeprowadzony tak jak opisano w Metodach (Rozdział 6.3).

Podanie domięśniowe koniugatów w NAC skutkowało otrzymaniem specyficznych przeciwciał IgG względem zastosowanych w koniugatach peptydów (**Rysunek 32**). Były to jednak poziomy bardzo niskie, znacznie niższe niż poziomy specyficznych przeciwciał IgG uzyskane dla białka nośnikowego. Odpowiedź na zastosowanie NAC3 i 13 była porównywalna, nie wykazano istotnych różnic pomiędzy tymi nanoadiuwantami. Uzyskano silniejszą odpowiedź na białko nośnikowe KLH w efekcie szczepienia protoszczepionką zawierającą zestaw koniugatów w nanoadiuwancie niż w przypadku szczepienia protoszczepionką zawierającą alum.

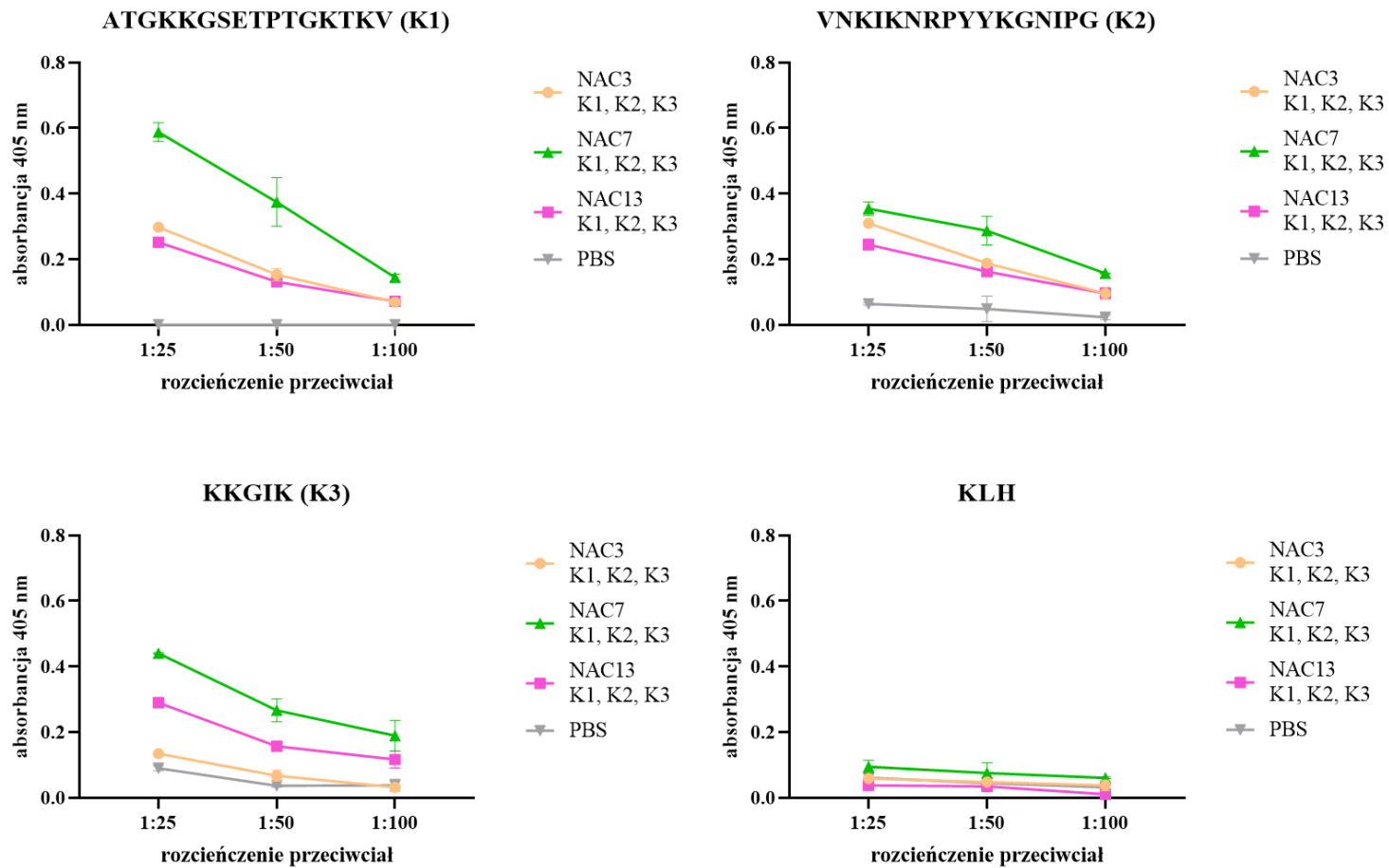
Podsumowując, protoszczepionka złożona z nanoadiuwantów (NAC3, 7 i 13) oraz zestawu koniugatów (K1, K2, K3) jest immunogenna zarówno w podaniu donosowym jak i domięśniowym. Wydaje się, że NAC13 wykazuje silniejsze działanie adiuwantowe, niż dwa pozostałe NAC. Podanie donosowe protoszczepionki z NAC powoduje powstanie przeciwciał IgG specyficznych zarówno względem koniugatów jak i nośnika. Podanie domięśniowe protoszczepionki z NAC skutkuje powstaniem bardzo silnej odpowiedzi względem nośnika, czyli KLH. Jest to bardzo ciekawe zjawisko, a jego przyczyny powinny zostać dokładnie poznane poprzez zbadanie sposobów procesowania antygenów podanych drogą donosową i domięśniową. Niezbędnym jest również poznanie roli NAC w tym procesie.



Rysunek 32 Poziomy specyficznych przeciwciał IgG względem sekwencji peptydowych będącymi składnikami koniugatów zastosowanych w protoszczepionkach podanych domięśniowo. Test immunoenzymatyczny został przeprowadzony tak jak opisano w Metodach (Rozdział 6.3.)

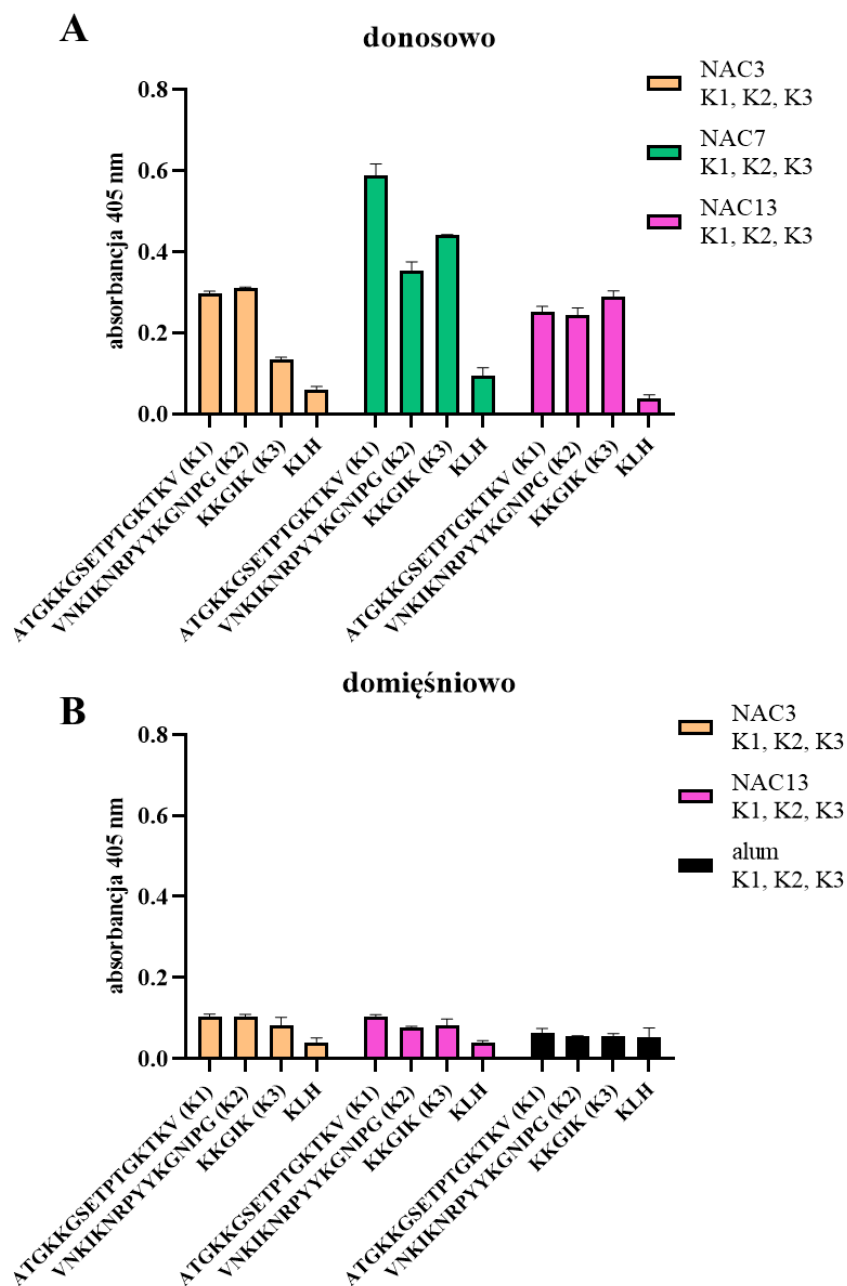
Zbadano odpowiedź na szczepienie protoszczepionkami w postaci zawartości specyficznych przeciwciał IgA w surowicy krwi u szczepionych myszy. Test immunoenzymatyczny przeprowadzono z użyciem płytek opłaszczonych pojedynczymi koniugatami oraz płytką opłaszczoną wyłącznie KLH. Odjęto wynik uzyskany dla KLH od wyników otrzymanych dla koniugatów celem określenia specyficznej odpowiedzi względem zastosowanych w koniugatach peptydów.

W podaniu donosowym, stwierdzono obecność specyficznych przeciwciał IgA względem koniugatów zastosowanych w protoszczepionce, przy czym poziom przeciwciał specyficznych względem KLH jest marginalnie niski (**Rysunek 33**). NAC7 indukuje najwyższy poziom specyficznych przeciwciał. Nie wszystkie koniugaty wywołują odpowiedź na tym samym poziomie. Wydaje się, że najsilniej immunizuje peptyd tworzący koniugat K1, następnie K3, a najsłabiej K2. Być może koniugaty różnią się między sobą liczbą obsadzonych peptydów przypadających na jedną cząsteczkę KLH. Jednakże, w przypadku specyficznych IgG indukowanych przez protoszczepionki podawane donosowo kolejność koniugatów pod względem siły immunizacji osadzonego na nich peptydu jest odmienna $K1 > K2 > K3$.



Rysunek 33 Poziomy specyficznych przeciwciał IgA względem sekwencji peptydowych będącymi składnikami koniugatów zastosowanych w protoszczepionkach podanych donosowo. Test immunoenzymatyczny został przeprowadzony tak jak opisano w Metodach (Rozdział 6.3.).

Podanie domięśniowe protoszczepionki nie wywołało efektu w postaci specyficznych względem koniugatów przeciwciał IgA (**Rysunek 34**).



Rysunek 34 Porównanie odpowiedzi na szczepienie w postaci specyficznych przeciwciał IgA względem peptydów i białka nośnikowego w zależności od drogi podania protoszczepionki. Badano poziom specyficznych przeciwciał w teście ELISA z zastosowaniem rozcieńczenia surowicy 1:25. Oznaczenie powtórzono trzykrotnie; na wykresach przedstawiono średnie z odchyleniem standardowym. Rys. 34A prezentuje wyniki uzyskane dla podania donosowego protoszczepionki. Rys. 34B prezentuje wyniki uzyskane dla podania domięśniowego protoszczepionki.

8. Dyskusja

Clostridioides difficile jest jednym z najczęstszych czynników etiologicznych biegunki szpitalnej, a długa i kosztowna terapia jest znacznym obciążeniem dla polskiej służby zdrowia. Co gorsza, Polska charakteryzuje się najwyższą liczbą nowych przypadków CDI (8,62/10 000 osobodni) wśród wszystkich krajów Unii Europejskiej [283]. Liczba ta rośnie nieprzerwanie od momentu stworzenia w 2010 roku europejskiej bazy dotyczącej nowych przypadków CDI. Uczestnictwo w tym programie nie jest obowiązkowe, w roku 2016 jedynie 46 z około tysiąca polskich szpitali udostępniło swoje dane. Dlatego też należy przypuszczać, że liczba nowych przypadków CDI opublikowanych w tej bazie jest mocno niedoszacowana. Dane Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny pokazują, że zapadalność na CDI w latach 2017-2018 utrzymuje się na stałym poziomie i wynosi odpowiednio 30,4 i 30,2 nowych przypadków na 100 000 mieszkańców (22,7 w 2016 roku). Liczba wszystkich zachorowań wynosiła 10084 w 2018 roku, z czego 87% przypadków wymagało hospitalizacji [138]. Większość infekcji CD w Polsce wywołują szczepy hiperwirulentne CD, takie jak rybotyp 027 i 176 [139]. Sytuacji nie poprawiają cyklicznie publikowane zalecenia dotyczące prewencji, diagnostyki i leczenia CDI [131,284]. Można się spodziewać dalszego pogorszenia sytuacji, gdyż ilość stosowanych antybiotyków w naszym kraju nie zmniejsza się i przewyższa średnią europejską [285]. Dodatkowo, CD jest bakterią stale zwiększającą oporność na stosowane do jej zwalczania antybiotyki. Wyizolowano szczepy dla których zanotowano podwyższone minimalne stężenia hamujące metronidazolu i fidaksomycyny, leków pierwszego rzutu w walce z CD. Wszystkie powyższe przesłanki wskazują na pilną potrzebę poszukiwania nowych sposobów zapobiegania i leczenia CDI.

Realizowana praca doktorska stanowi część dwóch projektów grantowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Pierwszy z nich, OPUS pt. „Mapowanie epitopów białek powierzchniowych *Clostridium difficile* oraz charakterystyka właściwości ochronnych koniugatu epitopu z białkiem nośnikowym w połączeniu z nowoczesnym nanoadiuwantem” (NCN, 2016/21/B/NZ6/02286) dotyczył określenia nowych epitopów białek powierzchniowych CD, które mogą być zastosowane w szczepionce lub w procesie otrzymywania przeciwciał leczniczych. Epitopy CD w koniugacie z białkiem nośnikowym zostały podane myszom w innowacyjnym adiuwancie (nanoadiuwancie) do zastosowań donosowych. Otrzymanie i charakterystyka

nanoadiuwantu została przeprowadzona w ramach projektu PRELUDIUM, pt. „Charakterystyka fizykochemicznych właściwości prototypu emulsyjnego nanoadiuwantu oraz jego wpływu na pobieranie i obróbkę antygeny przez komórki prezentujące antygen” (NCN, nr 2015/17/N/NZ6/03512). Niniejsza praca doktorska jest efektem realizacji tych dwóch nadrzędnych celów.

Najbardziej zaawansowane badania dotyczące szczepionek przeciwko CD obejmują antygeny oparte o jej toksyny. Wśród naukowców pojawiają się jednak opinie, że taka szczepionka może nie zapobiegać przenoszeniu się zakażenia między zaszczepionymi, a niezaszczepionymi pacjentami. Dlatego warto włączyć do szczepionki antygeny, które są dostępne dla przeciwciał na wcześniejszym etapie zakażenia, np. białka powierzchniowe bakterii, takie jak adhezyny, czy białka biorące udział w organizacji składników powierzchni komórki. To zagadnienie zostało szeroko opisane we wstępie do niniejszej pracy doktorskiej.

W tej pracy, poszukiwania nowych, powierzchniowych białek immunoreaktywnych rozpoczęto od zebrania bazy surowic pobranych od polskich pacjentów chorych na CDI oraz od zdrowych wolontariuszy i kobiet, w trakcie porodu (surowice krwi pępowinowej). Użycie surowic pobranych od pacjentów z CDI do identyfikacji nowych białek, ważnych w procesie infekcji, zostało już opisane w literaturze [207,208,218]. Jednakże, zastosowanie surowicy krwi pępowinowej w poszukiwaniach nowych białek immunoreaktywnych CD, a następnie do mapowania ich epitopów jest rozwiązaniem nowatorskim.

Sam transfer odporności między matką, a jej nienarodzonym dzieckiem jest obiektem badań już od wielu lat. U kręgowców, jedynie przeciwciała klasy IgG przekraczają barierę łożyska [286], a ich transport jest procesem aktywnym i wysoce selektywnym. Wykazano, że specyficzne przeciwciała skierowane przeciw antygenom powierzchniowym streptokoków grupy B przekazywane dziecku przez matkę mają właściwości ochronne [287]. Noworodki bardzo często są bezobjawowymi nosicielami CD. Jedną z teorii głosi, że noworodki nie chorują, ponieważ komórki tworzące nabłonek jelita nie posiadają odpowiednich receptorów dla toksyn CD i te nie mają możliwości zadziałania [288]. Wyniki naszych badań pokazują jednak, że surowica krwi pępowinowej jest wręcz wzbogacona w specyficzne przeciwciała przeciw-CD w stosunku do surowicy pobranej od zdrowych osób (**Rysunek 9**). Te przeciwciała mogą mieć właściwości silnie ochronne i również przyczyniać się do odporności noworodków na zakażenie CD.

Szczepy kliniczne bakterii CD będące przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej, zostały wyizolowane od polskich pacjentów. Są to szczepy o rybotypie 027, czyli hiperwirulentne, najczęściej występujące w polskich szpitalach. Powyższe podejście miało na celu odpowiedź na aktualne problemy występujące w naszym kraju związane z CDI, ale oczywiście nie wyklucza zastosowania ewentualnej szczepionki poza granicami Polski, jako że rybotyp 027 występuje właściwie na całym świecie [289]. Dodatkowo, zidentyfikowane w toku tej pracy nowe immunoreaktywne białko jest konserwatywne wśród wielu szczepów CD.

Białka powierzchniowe CD izolowano z użyciem metody opartej o zmywanie białek z powierzchni komórki za pomocą 1 M chlorku litu. Co ciekawe, profil wyizolowanych białek szczepu referencyjnego CD R20291 jest bardzo skąpy w stosunku do profili białek otrzymanych dla polskich szczepów klinicznych o tym samym rybotypie (**Rysunek 6**). Jest to bardzo ciekawe zjawisko i powinno zostać dokładniej zbadane. Następnie, białka powierzchniowe CD, rozdzielone z użyciem SDS-PAGE, poddano analizie Western blot, gdzie jako przeciwciał I-rzędowych użyto surowic pacjentów w trakcie CDI i surowic krwi pępowinowej. Wydaje się, że w przypadku polskich szczepów klinicznych wykryto więcej białek immunoreaktywnych z użyciem surowicy krwi pępowinowej niż z użyciem surowicy krwi pacjentów w trakcie zakażenia, co wydaje się niezwykle ciekawą obserwacją i potwierdza unikatowe właściwości surowicy krwi pępowinowej. W literaturze opisano zjawisko wzbogacania surowicy krwi pępowinowej w przeciwciała o wybranej specyficzności [290]. W przypadku CD, zjawisko bezobjawowego nosicielstwa lub przebycia zakażenia o bardzo lekkim przebiegu jest bardzo częste. Bardzo prawdopodobnym jest, że matki miały kontakt z CD lub z blisko spokrewnionymi szczepami bakteryjnymi, dzięki czemu zyskały specyficzne przeciwciała. Taki kontakt najwyraźniej wystarcza do wytworzenia specyficznych przeciwciał, które są przekazywane w dużej ilości nienarodzonemu dziecku, co świadczy o ich potencjalnych właściwościach ochronnych.

Białka immunoreaktywne wytypowane w wyniku analizy Western blot, następnie zidentyfikowano z użyciem spektrometrii mas. Pomimo zastosowania metody izolacji białek powierzchniowych zidentyfikowano głównie białka o lokalizacji typowo wewnątrzkomórkowej. Nie świadczy to jednak o niewłaściwym doborze metody ich izolacji, a raczej o tym, że białka te mogą pełnić dodatkowe funkcje w innych lokalizacjach niż te dotychczas opisane, jako tak zwane białka wielofunkcyjne (z ang. *moonlight proteins*) [257]. Przeprowadzono analizę przydatności zidentyfikowanych

białek jako antygenów szczepionki poprzez badanie rozpowszechnienia ich sekwencji aminokwasowych wśród sekwencji aminokwasowych białek innych bakterii i człowieka. W wyniku tej analizy odrzucono białka, które powszechnie występują u wielu innych bakterii, takie jak syntaza glutaminowa NADPH-zależna, oksydoreduktaza NAD(P)/FAD-zależna, acetylotransferaza acetylo-CoA, transferaza CoA, kinaza pirogronianowa, aminotransferaza alanino-glioksydanowa i racemaza prolinowa. Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego została scharakteryzowana przez nas w osobnej publikacji [258]. Kolejne ze zidentyfikowanych białek CD to peptydaza M24. W literaturze są doniesienia na temat podobnego białka występującego u bakterii *Clostridium perfringens* [291]. Opisano je jako białko zewnątrzkomórkowe o aktywności aminopeptydazy. Białko M24 bakterii CD zostało zmapowane przez mgr Katarzynę Pacygę, a opracowany epitop został włączony do niniejszej pracy doktorskiej na etapie badania właściwości immunogennych protoszczepionki. Dane dotyczące mapowania tego białka są w trakcie publikacji.

Kolejne białko zidentyfikowane w toku realizacji tej pracy, to białko Cwp22 i jest ono przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej. Analiza bioinformatyczna białka Cwp22 wykazała, że białko to jest silnie konserwatywne wśród wielu szczepów CD, niezależnie od rybotypu, czy profilu produkowanych toksyn. Z drugiej strony, białko to ma bardzo małą homologię z białkami o podobnej funkcji występującymi u innych organizmów. Obie te cechy wskazują, że białko Cwp22 jest bardzo dobrym kandydatem na antygen szczepionkowy. W 2019 roku pojawiły się doniesienia potwierdzające to założenie. Cwp22 to białko o aktywności L,D-transpeptydazy, czyli enzymu sieciującego peptydoglikan. Cwp22 bierze udział w produkcji peptydoglikanu o nietypowym dla bakterii usieciowieniu, a mianowicie 3→3 [191], typowym dla mykobakterii [292]. U bakterii CD występują trzy paralogi tego enzymu: Ldt_{Cd1}, Ldt_{Cd2}, Ldt_{Cd3} [293]. Wyłączenie aktywności dwóch pierwszych obniża zawartość peptydoglikanu o usieciowaniu 3→3. Nie było możliwe, jak dotąd, usunięcie genu trzeciego enzymu przez co nie do końca poznano znaczenie biologiczne białka Cwp22. Nie mniej jednak, rodzaj sieciowania peptydoglikanu wpływa na oporność bakterii względem antybiotyków. Bakterie, które mają peptydoglikan o typowym sieciowaniu, czyli 4→3 są wrażliwe na antybiotyki β-laktamowe. U bakterii CD ten typ peptydoglikanu również występuje ale stanowi jedynie 30% całego peptydoglikanu. Sieciowanie 3→3, które przeważa u CD, może zostać zahamowane jedynie poprzez użycie antybiotyku z grupy karbapenemów. Zatem, zmiana typu sieciowania peptydoglikanu może mieć bardzo duże

znaczenie w procesie nabywania oporności względem stosowanych przeciw CD antybiotyków, chociaż jak dotąd mechanizm taki pokazano jedynie w przypadku *E. faecium* [294]. Białko Cwp22 jest również białkiem plejotropowym, gdyż jego mutacja wpływa nie tylko na rodzaj sieciowania ale i na obniżenie produkcji toksyn na wczesnym etapie wzrostu bakterii, opóźnia sporulację, obniża adhezję i ruchliwość bakterii [295]. Wszystko powyższe wskazuje na to, że białko Cwp22 lub jego epitopy są doskonałymi kandydatami szczepionkowymi.

Dane literaturowe pokazują, że peptyd może być bardziej immunogeny niż całe białko, co wyraża się w wyższym mianie wzbudzanych przeciwciał [291]. Co więcej, szczepionka oparta o krótkie peptydy jest prostsza w produkcji i umożliwia przygotowanie szczepionki poliwalentnej przez połączenie kilku epitopów z jednym białkiem nośnikowym. Nie ma potrzeby użycia całej bakterii, dzięki czemu, minimalizuje się prawdopodobieństwo kontaminacji szczepionki. Dodatkowo, zastosowanie dokładnie scharakteryzowanych sekwencji aminokwasowych pozwala uniknąć nieprzewidzianych reakcji krzyżowych i wystąpienia zjawiska autoimmunoreaktywności. Istnieje wiele doniesień na temat udanych prób zastosowania szczepionek opartych o epitopy [296–299].

W toku tej pracy zmapowano epitopy białka Cwp22 bakterii CD poprzez połączenie metod bioinformatycznych i empirycznych. Metodami bioinformatycznymi wytypowano sekwencje prawdopodobnych epitopów dla komórek B i T rozpoznających antygen. Do tak otrzymanych sekwencji aminokwasowych dodano sekwencje eksponowanych pętli, które uzyskano na podstawie analizy struktury drugorzędowej białka Cwp22. Poprzez nałożenie powyższych sekwencji uzyskano 16-aminokwasowe peptydy, które następnie zsyntezowano chemicznie z użyciem techniki PEPSCAN [236]. W procesie wyboru sekwencji do syntezy skupiono się na regionie funkcjonalnym białka, czyli C-końcowej części białka, która jest eksponowana do środowiska (zakres od 1 do 370 aminokwasu białka) i składa się w dużej mierze z wolnych pętli i skrętów, które są łatwo dostępne dla przeciwciał [300]. Część funkcjonalną białka stanowi domena YkuD odpowiedzialna na aktywność L,D-transpeptydazy. Druga część białka, N-końcowa to przede wszystkim konserwatywne domeny kotwiczące białko do ściany komórkowej bakterii, głównie zbudowane z α -helis, trudno dostępne dla przeciwciał. Programy do przewidywania epitopów dla komórek B również wytypowały sekwencje zlokalizowane głównie w badanym zakresie sekwencji (20 z 35 wytypowanych sekwencji znajdowało się w sekwencji pokrywającej aminokwasy od 1 do 370).

Badanie immunoreaktywności wytypowanych 16-aminokwasowych sekwencji z surowicami pacjentów z CDI, zdrowych ochotników i surowicami krwi pępowinowej pozwoliło na wytypowanie kilku kandydatów do dalszej analizy, której celem było określenie epitopów białka Cwp22. Reaktywność przeciwciał surowicy krwi pępowinowej, z zsyntezowanymi chemicznie peptydami białka Cwp22, jest wyższa niż w przypadku surowicy krwi pobranej od zdrowych ochotników, co wskazuje na wzbogacenie surowicy krwi pępowinowej o te przeciwciała. W trakcie mapowania, wytypowano region białka o zwiększonej immunoreaktywności zawierający się pomiędzy aminokwasami Ser47, a Gly98. Jest to region poprzedzający domenę katalityczną, która zawiera się prawdopodobnie pomiędzy aminokwasami His119, a His143 [301]. Przeprowadzono dokładniejszą analizę regionu pomiędzy aminokwasami Ser47, a Gly98.

Wynikiem mapowania białka Cwp22 są trzy peptydy o najwyższej immunoreaktywności, a w ich sekwencjach zlokalizowano trzy epitopy białka Cwp22: ⁵⁴EFRVAT⁵⁹, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷. Epitop ⁵⁴EFRVAT⁵⁹ jest zlokalizowany w domenie funkcjonalnej białka ale nie w centrum katalitycznym. Ten epitop tworzy zwój, w odróżnieniu do struktury jaką przyjmuje w białku natywnym, którą jest β -kartka. Epitop ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ również tworzy zwój, natomiast epitop ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷ przyjmuje strukturę α -helisy, a w białku natywnym sekwencja ta była zlokalizowana na wolnej pętli. Różnice w tworzonych przez te epitopy strukturach drugorzędowych, w stosunku do tych w białku natywnym, powinny zostać scharakteryzowane pod kątem wpływu na ich immunoreaktywność. W przypadku spadku immunoreaktywności należałoby rozważyć jedną z dostępnych metod, które mają na celu zmianę struktury peptydu tak aby przypominała tą obecną w białku natywnym. Metody te polegają na dodaniu aminokwasów stabilizujących wybraną strukturę drugorzędową [302,303].

Liczba aminokwasów tworzących trzy powyżej opisane epitopy zawiera się pomiędzy sześć, a dziesięć, co odpowiada ogólnie przyjętemu założeniu, że epitopy liniowe powinny zawierać co najmniej pięć do dwudziestu dwóch aminokwasów [304] lub od sześciu do dziewięciu aminokwasów polarnych [305]. Badania przeprowadzone w naszym Laboratorium wskazują, że nawet krótsze, czteroaminokwasowe sekwencje, mogą być silnie immunoreaktywne [306]. Inne badania sugerują jednak, że to peptydy zawierające piętnaście aminokwasów są cząsteczkami o najlepszych właściwościach immunogennych [307]. W dalszych badaniach być może konieczne będzie dodanie

aminokwasów do sekwencji zidentyfikowanych epitopów celem zwiększenia ich immunogenności. Dodatkowo peptydy można poddać cyklizacji, czy też wymianie jednych aminokwasów na inne [308].

Szczepionki oparte o całe białka i pochodzące od nich peptydy powinny zostać dokładnie zbadane pod kątem możliwych reakcji krzyżowych. Zastosowanie w szczepionce antygenów o zbyt dużym podobieństwie do sekwencji aminokwasowej białek pochodzących od ludzkiej mikrobioty lub własnych antygenów może dać trudne do przewidzenia efekty uboczne. Przykładowo, białko dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego bakterii CD może mieć udział w wywoływaniu odpowiedzi na białka własne gospodarza i prowadzić do powstania chorób autoimmunologicznych [258]. Kilka doniesień opisuje powiązanie między szczepieniem przeciwko Wirusowemu Zapaleniu Wątroby typu B (WZW B), a zjawiskiem demielinizacji, które może prowadzić do stwardnienia rozsianego [309,310]. Stosowanie szczepionki przeciw WZW B zostało również powiązane z reumatoidalnym zapaleniem stawów [311]. Badanie sekwencji trzech epitopów ⁵⁴EFRVAT⁵⁹, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷ pod kątem ich występowania w znanych autoepitopach nie wykazała żadnych powiązanych sekwencji. Nie znaleziono również białek ludzkich, których sekwencje zdeponowano w bazie NCBI, w których te sekwencje by występowały.

Istnieje również możliwość oddziaływania antygenów zawartych w szczepionce z białkami mikrobioty. Williams i inni, badali odpowiedź ludzi na szczepienie dwoma białkami ludzkiego wirusa niedoboru odporności gp120 i gp41. Okazuje się, że odpowiedź odpornościowa jest skierowana przeciwko białku gp41, a przeciwciała, które powstały nie miały działania neutralizującego i wchodziły w reakcje krzyżowe z mikrobiotą jelit gospodarza [312]. Celem uniknięcia takich reakcji zbadano występowanie sekwencji aminokwasowych trzech zidentyfikowanych epitopów (⁵⁴EFRVAT⁵⁹, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷) w białkach mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobioty człowieka. Nie znaleziono białek organizmów budujących mikrobiotę człowieka, wśród zdeponowanych w bazie NCBI, które by zawierały sekwencje któregoś z trzech badanych epitopów białka Cwp22. Analiza homologii sekwencji nieograniczona jedynie do mikroorganizmów mikrobioty człowieka wykazała, że epitop ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷ jest charakterystyczny tylko dla CD. Sekwencja ⁵⁴EFRVAT⁵⁹ została zlokalizowana w białku hipotetycznym bakterii *Paenibacillus rhizosphaerae* o znikomym znaczeniu klinicznym, gdyż jest to bakteria występująca w systemach korzeniowych roślin [262]. Epitop ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ został

w całości lub częściowo zlokalizowany w białkach innych organizmów. Prawdopodobnie jest to związane z tym, że epitop ten znajduje się w konserwatywnej domenie COG5263, która może występować w wielu białkach [261]. Przed zastosowaniem tego białka w szczepionce należy się przyjrzeć bliżej możliwym reakcjom krzyżowym.

Podsumowując, w toku badań dotyczących mapowania białka Cwp22 bakterii CD określono 3 epitopy: ⁵⁴EFRVAT⁵⁹, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷, które mogą być zastosowane w szczepionkach przeciwko CD. Wartością dodaną tych badań było opracowanie procedury ewaluacji peptydów pod kątem ich przydatności jako antygenów szczepionkowych, poprzez określenie ich rozpowszechnienia wśród sekwencji białek innych organizmów, w tym człowieka.

Niezbędnym składnikiem nowoczesnej szczepionki podjednostkowej jest adiuwant, a brak adiuwantów, które można by zastosować w szczepionkach dośluzówkowych jest główną barierą w rozwoju tego typu szczepionek. Stworzenie i charakterystyka nowego adiuwanta, który można by zastosować w szczepionkach dośluzówkowych było drugim celem nadrzędnym niniejszej pracy doktorskiej.

Jednym z bardziej obiecujących rozwiązań jest nanoemulsja, która została oparta o olej sojowy i mieszaninę detergentów kationowych. Nanoemulsja (NE) początkowo była stosowana do inaktywacji patogenów, które następnie służyły do immunizacji [313,314]. NE badano również w połączeniu z antygenami podjednostkowymi [122,315,316]. NE podana donosowo wzbudza odpowiedź typu Th1 i Th17 oraz specyficzne przeciwciała, zarówno systemowo, jak i miejscowo na śluzówce [121]. Adiuwanty oparte o emulsję mają duże szanse stać się pierwszymi wyspecjalizowanymi adiuwantami do zastosowania w szczepionkach dośluzówkowych.

Nanoadiuwanty składają się z łatwo dostępnych związków, dobrze scharakteryzowanych, stosowanych w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym i spożywczym od dekad. Ma to istotne znaczenie w procesie produkcji szczepionki, jako że niezmiennosc składników jest gwarantem niezmienności składu szczepionki przez wiele lat stosowania. Niektóre ze szczepionek wynalezione w latach 40' i 50' ubiegłego wieku są nadal w użyciu [317]. W tym wypadku zastosowanie składników pochodzenia chemicznego ma przewagę nad składnikami pochodzenia biologicznego czyli, np. nad stosowanym w nanoemulsjach olejem sojowym [122,318]. Wszystkie składniki stosowane w NAC znajdują się na liście GRAS (z ang. *Generally Recognized As Safe*), czyli produktów uznanych za bezpieczne. NAC składają się z oleju silikonowego, który

stanowi bazę, detergentów niejonowych i kationowych, rozpuszczalnika organicznego i wody ultraczystej. Otrzymanie NAC jest proste i tanie oraz łatwe do przeskalowania na potrzeby masowej produkcji z użyciem już stosowanych w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym maszyn.

Wielkość cząsteczek adiuwanta opartego o emulsję ma wpływ na jego właściwości reologiczne, stabilność, farmakokinetkę i działanie biologiczne [319]. Wielkość kropeł NAC wynosi mniej niż 1 μm . Analizowano zależność pomiędzy wielkością kropeł, a składem NAC. Nie zaobserwowano, aby pojedynczy składnik determinował wielkość kropli, ale raczej oddziaływania pomiędzy nimi. Dlatego każdy nowy nanoadiuwant musi zostać scharakteryzowany pod tym kątem.

Potencjał zeta kropeł NAC wynosi od 24,4 do 65,2 mV. Dane literaturowe pokazują, że cząsteczki o ładunku dodatnim ulegają fagocytozie w większym stopniu niż cząsteczki o ładunku ujemnym [320]. Ładunek dodatni, jakim obdarzone są krople nanoadiuwantu, sprzyja ich pobieraniu przez komórki fagocytyjące, a co za tym idzie również podanego razem z NAC antygeny. Z danych wynika, że to rodzaj detergentu kationowego determinuje potencjał zeta NAC. Trzy ze stosowanych w tych badaniach detergentów, czyli BDMHDAC, CTMAC, and CPC nadawały NAC silnie dodatni ładunek, który wynosił od 56,2 mV do 65,2 mV. Detergent kationowy o nazwie BDMDDAC nadawał relatywnie niski ładunek przygotowanym z niego NAC, który wynosił od 24,4 mV do 36,1 mV. Dodatkowo, w przypadku NAC1 i NAC13, zaobserwowano efekt różnicujący zastosowanego detergentu niejonowego (44,4 mV vs. 64,4 mV). Warto ten aspekt zbadać w przyszłości.

Okres przydatności do użycia dla obecnie stosowanych szczepionek to średnio dwa lata, pod warunkiem, że są bezwzględnie przechowywane w warunkach chłodniczych. Nawet krótkotrwałe zmiany temperatury przechowywania szczepionki mają wpływ na jej aktywność przez co duża część produkowanych szczepionek dociera do miejsca przeznaczenia jako nieaktywne [321]. Ma to szczególne znaczenie w krajach Afryki, gdzie zachowanie zimnego łańcucha dostaw stanowi ciągle ogromne wyzwanie. Zbadano stabilność trzynastu NAC w trakcie ich przechowywania przez co najmniej dwanaście miesięcy. Dziewięć z trzynastu NAC nie zmieniło znacząco swoich parametrów, takich jak wielkość kropeł i potencjał zeta przez dwanaście miesięcy przechowywania. Teoretycznie, im większe krople tym mniejsza stabilność mieszaniny [322]. W przypadku NAC nie zaobserwowano zależności między wyjściową wielkością kropeł, a stabilnością emulsji. Cztery NAC (NAC1, 8, 11, i 12), które okazały się

niestabilne charakteryzowały się wielkością kropeł równą kolejno 388,8, 529,4, 383,1 i 405,3, czyli nie należały do grupy NAC o największym rozmiarze kropeł. Wielkość kropeł dziewięciu stabilnych NAC wykazywała tendencję spadkową w trakcie dwunastu miesięcy przechowywania. Co jednak nie świadczy o utracie stabilności, a raczej o osiągnięciu stanu równowagi. Potwierdzają to zmiany współczynnika polidispersyjności, którego wartość spada między pierwszym pomiarem, a ostatnim. Średnio, wielkość kropeł wszystkich NAC uległa zmianie o +/-28,38 nm (5,77%) i była słabo skorelowana z wyjściową wartością współczynnika polidispersyjności (współczynnik Pearsona wynosił 0,25).

Dwanaście z trzynastu badanych NAC nie zmieniło istotnie wartości potencjału zeta kropeł emulsji w trakcie ich przechowywania przez co najmniej rok. Zmiany w potencjale zeta dla NAC1 były istotnie różne od rozkładu normalnego ($p < 0,05$). Dla wszystkich badanych NAC, oprócz NAC13, zmierzone wartości potencjału zeta zwiększyły się nieznacznie po dwunastu miesiącach przechowywania. Obserwowano podobny efekt w przypadku przechowywania liposomów opartych o mieszaninę chitosanu i fosfatydyloetanolaminy [323]. Uważa się, że mieszaniny zawierające cząsteczki o ładunku większym niż 30 mV są trwalsze ze względu na efekt odpychania się poszczególnych cząstek od siebie [320]. Potencjał zeta kropeł NAC zawiera się pomiędzy 24,4 do 65,2 mV, a potencjał zeta jednego niestabilnego pod tym kątem NAC1 wynosił 44,4 mV. Zatem, powyższa zasada dotycząca trwałości mieszaniny o potencjale zeta wyższym niż 30 mV, nie do końca ma w tym przypadku zastosowanie. Biorąc pod uwagę zmiany wielkości kropeł tworzących NAC i ich ładunku, w trakcie dwunastu miesięcy przechowywania, do dalszych badań wytypowano dziewięć stabilnych NAC.

NAC, jako potencjalne adiuwanty dośzluzówkowe, muszą spełniać szereg wymogów. Jednym z nich jest oddziaływanie z mucyną, która jest głównym białkowym składnikiem śluzu pokrywającego, np. nabłonek oddechowy. Mucyna jest białkiem o ładunku ujemnym, mocno usieciowanym, które działa jak lubrykant wiążąc wodę [324]. Wydłużony kontakt antygeny ze śluzówką wpływa korzystnie na jego pochłanianie przez komórki nabłonka [109]. Można to osiągnąć poprzez zastosowanie odpowiednich, naładowanych dodatnie, nośników dla tych antygenów [325]. Sześć z dziewięciu badanych NAC (NAC2, 3, 4, 6, 7 i 13) nie zmieniało rozmiaru kropeł po dodaniu do nich mucyny. Dla pozostałych trzech (NAC5, 9 i 10) odnotowano znaczne powiększenie rozmiaru kropeł emulsji. Niemniej jednak, wszystkie badane NAC oddziaływały elektrostatycznie z mucyną, co wyraża się w znacznym obniżeniu potencjału kropeł

z wartości dodatnich na ujemne. Być może mała zmiana wielkości kropeł po dodaniu mucyny do NAC2, 3, 4, 6, 7 i 13 wynika z wolniejszego tempa narastania kolejnych warstw mucyny. W badaniach przeprowadzonych przez Pereira de Sousa i innych, dotyczących oddziaływań nanocząstek zbudowanych z chitosanu i mucyny wykazano, że proces budowania kolejnych warstw mucyny, a co za tym idzie zwiększanie rozmiaru nanocząstek, jest rozłożone w czasie [326]. Największy wzrost wielkości cząstek następował po około godzinie inkubacji nanocząstek chitosanu i mucyny. W badaniach opisanych w niniejszej pracy doktorskiej pomiar wielkości cząstek następował do pół godziny od zmieszania NAC i mucyny. Różnice w oddziaływaniach poszczególnych NAC z mucyną są zaskakujące i powinny być nadal badane, przykładowo z użyciem mikroskopii elektronowej [120]. Jednym z urządzeń do badania oddziaływań elektrostatycznych jest system BIACORE wykorzystujący pomiar rezonansu plazmonów powierzchniowych [327]. Niestety, podjęte próby pomiaru tym urządzeniem oddziaływań NAC z mucyną nie dały danych wystarczająco dobrej jakości (dane niepokazane).

Zbadano oddziaływania NAC z owalbuminą w kilku rodzajach eksperymentów. Badano jak dodatek OVA wpływa na właściwości fizykochemiczne NAC. Dla ośmiu badanych NAC (NAC2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 13) z dziewięciu, odnotowano spadek wartości potencjału zeta kropeł. Tylko sześć z nich (NAC2, 3, 4, 6, 7 i 13) zwiększyło wielkość kropeł po zmieszanu z OVA. Nie świadczy to jednak o tym, że pozostałe NAC nie wiążą owalbuminy. Podobny rodzaj badań przeprowadzony przez Zhang i innych, z użyciem nanocząstek zbudowanych z chitosanu związanego z kurdlanem pokazał, że spadek potencjału zeta nanocząstek z jednoczesnym utrzymaniem rozmiaru tych nanocząstek jest obserwowany podczas wejścia owalbuminy do wnętrza kropeł [328]. W badaniach opisanych w niniejszej pracy doktorskiej, użyto znacznie większych stężeń owalbuminy, niż w badaniach Zhang i innych i dlatego część NAC mogła łądować znacznie więcej białka do wnętrza swoich kropeł i tym samym zwiększyć ich wielkość. Wykazano, że NAC5, 9 i 10 cechują się wysokim potencjałem zeta i mogą tworzyć bardziej zwarte krople w wyniku oddziaływania z ujemnie naładowaną owalbuminą i przez to wielkość kropeł mogła nie ulec powiększeniu. Należy również wspomnieć, że NAC5, 9 i 10 łądowały o połowę białka mniej do wnętrza kropeł niż pozostałe NAC. W przypadku NAC2, 3, 4, 6, 7 i 13 nie można również wykluczyć wiązania się części białka do powierzchni kropeł NAC. Te zróżnicowane oddziaływania NAC z OVA powinny zostać dalej zbadane w kontekście ładunku tego białka i zróżnicowanych potencjałów zeta NAC.

W drugim rodzaju eksperymentów zbadano kinetykę uwalniania OVA od oddziaływań z NAC. Trzy z badanych NAC (NAC3, 7 i 13) wiązały całe dodane białko. Wiązanie to było trwałe przez co najmniej 24 godziny. Powstanie odpowiedzi immunologicznej na podany antygen zależy od tego, czy ten antygen, w odpowiednim stężeniu, przedostanie się przez śluzówkę do wyspecjalizowanych komórek odpornościowych. Antygen, w stanie nienaruszonym, musi zostać przetransportowany przez warstwę śluzu do nabłonka i dalej do głębszych warstw śluzówki [109]. Dlatego też wskazane jest, żeby antygen nie został uwolniony zbyt wcześnie, ponieważ jego rozcieńczenie w śluzie mogło by wpływać na efektywność szczepionki lub prowadzić do powstania tolerancji względem podanego antygeny [329]. Na transport antygeny mają wpływ również warunki panujące w jamie nosowej. Stężenie jonów i pH śluzu wyściełającego jamę nosową podlegają wahaniom i są zależne od pory dnia i stanu zdrowia człowieka [253,330]. NAC3, 7 i 13 nie zmieniały istotnie swoich właściwości, gdy były przechowywane w zakresie od 0 do nawet 0,5 M NaCl (stężenie w soli fizjologicznej to około 0,15 M) oraz w zakresie pH od 5,8 do 8,2. Podsumowując, NAC3, 7 i 13 dzięki zachowaniu stabilności i trwałemu wiązaniu antygeny mają szansę przetransportować go do głębszych warstw śluzówki, gdzie ten będzie dalej poddawany obróbce przez komórki układu odpornościowego.

Nie tylko pojedyncze składniki szczepionki muszą być odporne na działanie warunków niekorzystnych, takich jak np. zmiany temperatury w trakcie ich transportu, ale także poszczególne składniki nie powinny wpływać negatywnie na stabilność innych. Opisano przykłady, gdy to adiuwant wpływał destabilizująco na inne składniki szczepionki [331]. Dziewięć stabilnych NAC zbadano pod kątem ich wpływu na integralność białka modelowego. Trzy, z badanych NAC (NAC3, 7 i 13), zachowywały integralność antygeny do sześciu miesięcy w warunkach chłodniczych. Przy czym wydaje się, że NAC7 zachowywało integralność OVA w najwyższym stopniu w porównaniu do pozostałych NAC. Z tego względu dalsze badania ograniczono jedynie do tych trzech NAC, które tylko w małym stopniu zmieniały integralność OVA (NAC3, 7 i 13). Należy jednak zbadać przydatność pozostałych NAC w użyciu z antygenami innymi niż białkowe, np. DNA bakteryjne, polisacharydy, czy ich koniugaty z peptydami.

Wszystkie składniki szczepionek muszą podlegać sterylizacji. Zbadano wpływ sterylizacji w autoklawie na właściwości kropeł NAC. Sterylizowano NAC3, 7 i 13 przez 15 minut w 121 °C. Sterylizacja nie wpływała na zmianę wielkości kropeł NAC3, 7, czy 13 oraz na potencjał zeta kropeł NAC13. Sterylizacja w autoklawie obniżała potencjał

zeta kropel NAC3 i NAC7. Podobny efekt zaobserwowano w innych badaniach dla cząsteczek chitosanu [332,333]. NAC, po sterylizacji, nadal mają wysoki ładunek dodatni, dlatego też obniżenie ładunku spowodowane sterylizacją może mieć jedynie znikomy wpływ na ich właściwości biologiczne. Nie mniej jednak, należy szczegółowo zbadać ten aspekt. Należy również rozważyć inne metody sterylizacji NAC, takie jak działanie promieniowania mikrofalowego, sterylizacja radiacyjna czy użycie promieniowania UV.

Umierające komórki stymulują komórki dendrytyczne do dojrzewania i prezentacji antygenów komórkom immunokompetentnym poprzez sygnały o niebezpieczeństwie. Co więcej, mechanizm śmierci komórki nie powinien być fizjologiczny, przykładowo zachodzący na drodze apoptozy, gdyż tak umierająca komórka nie aktywuje komórek dendrytycznych [334]. Sygnałem do aktywacji mogą być wszystkie elementy komórki, które w normalnych warunkach powinny się znajdować w jej wnętrzu, a w przypadku niekontrolowanej śmierci wydostają się na zewnątrz, takie jak: białko HMGB1 [335], nukleotydy [336,337], czy białka szoku cieplnego [338]. Zdefiniowano stężenie subcytotoksyczne NAC3, 7 i 13, czyli takie, które powoduje śmierć co najwyżej 40% komórek i które jest wystarczające do wyzwolenia sygnałów o niebezpieczeństwie [272]. Badane NAC wykazują działanie cytotoksyczne o różnej sile. NAC13 działa najbardziej cytotoksycznie w stosunku do mysich komórek dendrytycznych i makrofagów. W przypadku komórek nabłonka oddechowego, wszystkie trzy NAC wykazują podobnie działanie. Należałoby zbadać mechanizm, na drodze którego NAC indukują śmierć komórki, np. poprzez zbadanie ekspresji odpowiednich kaspaz. Badania przeprowadzone z użyciem nanoemulsji pokazują, że śmierć komórki może zostać wywołana na drodze kilku mechanizmów, a mianowicie apoptozy, autofagii i nekrozy [339].

NAC nie zawierają w swoim składzie immunostymulatorów i dlatego one same nie indukują powstawania cytokin prozapalnych, jednakże w połączeniu z progowymi stężeniami lipopolisacharydu wzmacniają wytwarzanie TNF- α przez makrofagi, nawet czterokrotnie. Doniesienia literaturowe dokumentują, że adiuwanty oparte o emulsję mogą wpływać korzystnie na ekspresję receptorów TLR2 i TLR4, które są receptorami LPS-u u komórek immunokompetentnych [340]. Być może ten sam mechanizm zadziałał i w przypadku NAC. Dalsze badania na ten temat są bezwzględnie konieczne.

Efektywne pobieranie antygeny dostarczonego na śluzówkę jest czynnikiem limitującym działanie szczepionek dośluzówkowych [341]. Jednym ze sposobów w jaki

NAC ułatwia ten proces jest przedłużanie kontaktu ze śluzówką poprzez oddziaływanie z mucyną. Zbadano czy NAC wpływa na sam pobór antygeny przez komórki nabłonka oddechowego linii TC-1 i komórki dendrytyczne linii JAWSII. Oba rodzaje komórek odpowiadają za bezpośredni pobór próbek ze światła jamy nosowej lub jelita [342]. NAC3, 7 i 13 ułatwiały pochłanianie DQ-OVA zarówno przez komórki dendrytyczne, jak i komórki nabłonkowe. Nie mniej jednak indukcja pochłaniania DQ-OVA przez komórki nabłonka oddechowego wymagała zastosowania wyższych stężeń NAC niż w przypadku komórek dendrytycznych. Może to wynikać z tego, że komórki nabłonka, jako te tworzące fizyczną barierę, wykazują większą odporność na czynniki egzogenne niż komórki położone w głębszych warstwach śluzówki. Proces na drodze, którego dochodzi do poboru antygeny jest nieznanym ale istnieje na ten temat kilka teorii. Wiadomo, że to rozmiar cząsteczki determinuje proces, na drodze którego zostaje ona pobrana przez komórkę żerną. Cząsteczki o rozmiarach większych niż 500 nm zwykle ulegają fagocytozie, a mniejsze pinocytozie [343], a przy cząsteczkach o silnie dodatnim ładunku możliwa jest bezpośrednia penetracja błony [344]. Okazuje się, że stopień poboru liposomów przez makrofagi zależy wprost proporcjonalnie od ich wielkości do momentu aż te przekroczą rozmiar 1 μm . Dalsze zwiększanie rozmiaru liposomu nie wpływało na stopień jego pochłaniania. Krople NAC3, 7 i 13 mają rozmiar kolejno 534 nm, 405,5 nm i 623,6 nm i, co ciekawe, zaobserwowano zależność odwrotnie proporcjonalną między stopniem ich pochłonięcia przez komórki dendrytyczne a rozmiarem, co oznacza, że większe krople były pochłanianie w mniejszym stopniu (NAC7 vs. NAC13, $p = 0,0177$). Wielkości kropeł NAC3, 7 i 13 oscylują wokół wartości 500 nm dlatego procesy odpowiedzialne za ich pobór mogą być różne. Zjawisko to powinno zostać dokładnie zbadane.

Wykazano korzystny wpływ NAC7 na przekazywanie DQ-OVA pomiędzy komórkami nabłonka, a komórkami dendrytycznymi. Jest kilka możliwych mechanizmów, na drodze których NAC może wspomagać przekazywanie antygeny pomiędzy komórkami nabłonka, a komórkami dendrytycznymi. Grupa Wattiaux i inni, badała wpływ dodatku detergentów kationowych na stabilność błon biologicznych stosując jako model błonę lizosomalną [345]. Dodatek kationowego detergentu (DODAP) wpływał destabilizująco na błonę lizosomu, co przejawiało się w wyciekaniu enzymów lizosomalnych. Podobny mechanizm może dotyczyć błony komórkowej, która na skutek destabilizacji przez dodatek detergentu kationowego może stać się bardziej płynna, a proces poboru antygenów ułatwiony. Z drugiej strony, destabilizacja błony,

a szczególnie ładunków obecnych po obu jej stronach, jest sygnałem o tym, że w komórce dochodzi do niekorzystnych procesów. Taki sygnał występuje np. w przypadku apoptozy [346,347], a komórki apoptotyczne są wychwytywane przez komórki żerne co również może ułatwiać przekazywanie antygeny. Kolejny mechanizm, za pomocą którego mogą działać NAC, jest wpływ na zmiany w szlakach sygnałowych komórki [344], a co za tym idzie zmian ekspresji receptorów na powierzchni komórki, które mogłyby ułatwiać rozpoznanie komórek nabłonkowych przez komórki dendrytyczne i przekazywanie antygeny.

Kontrolowany efekt cytotoksyczny NAC wykazany w badaniach *in vitro* nie może jednak powodować widocznego efektu toksycznego u szczepionych myszy. Dlatego zbadano wpływ wysokich stężeń NAC na stan zdrowia myszy zaszczepionych donosowo i domięśniowo. Przeprowadzona siedmiodniowa obserwacja myszy nie wykazała negatywnego wpływu NAC w postaci wystąpienia u myszy objawów dystresu, takich jak spadek wagi ciała, zmiana zachowania, czy opuchlizna w miejscu podania szczepionki. Z tego eksperymentu wynika, że NAC są bezpieczne w podaniu donosowym i domięśniowym.

Zbadano właściwości immunogenne protoszczepionek składających się z NAC3, 7 lub 13 i zestawu koniugatów (K1, K2, K3) zawierających epitopy białek powierzchniowych CD i białko nośnikowe (KLH). Białko nośnikowe KLH jest często stosowane do immunizacji myszy, również donosowo. Zwykle szczepieniu donosowemu białkiem KLH towarzyszy adiuwant w postaci toksyny B cholery [348,349]. Mutanty toksyny cholery są uznawane za efektywne i bezpieczne adiuwanty donosowe, jednakże nie są stosowane u ludzi [350,351]. Dodatkowo, dużym problemem w ich powszechnym zastosowaniu może być ich cena. Nanoadiuwanty stanowią dużo tańszą alternatywę.

W wyniku szczepienia myszy protoszczepionką zawierającą NAC i zestaw koniugatów uzyskano specyficzną odpowiedź humoralną. Te same protoszczepionki, ale podane na dwa różne sposoby indukowały ten sam poziom całkowitych przeciwciał IgG. Dodatkowo, NAC7 wykazuje ciekawe działanie polegające na inhibicji produkcji przeciwciał IgG. NAC podane donosowo z zestawem koniugatów indukowały znacznie wyższe poziomy całkowitych przeciwciał IgA w stosunku do grupy szczepionej domięśniowo alum z zestawem koniugatów. Porównanie dwóch dróg podania protoszczepionek opartych o NAC wskazuje, że są one pod kątem poziomu indukowanych przeciwciał IgA znacznie bardziej efektywne w podaniu donosowym.

Wykazano, że zastosowanie NAC jako adiuwanta prowadziło do uzyskania co najmniej takiego samego poziomu przeciwciał IgG jaki uzyskiwano po zastosowaniu alum jako adiuwanta przy podaniu domięśniowym. Alum jest powszechnie stosowanym adiuwantem, ale może być stosowane jedynie w szczepionkach podawanych drogą parenteralną, co wiąże się z koniecznością klócia pacjenta [352] i wiele dodatkowych problemów, jak np. możliwość transmisji chorób przekazywanych wraz z krwią, (zakażenie WZW typu B), czy też problem zagospodarowania odpadów medycznych [353,354]. Zastosowanie NAC, które jest co najmniej tak aktywne jak alum, ale w podaniu donosowym wydaje się być dużo bardziej korzystnym rozwiązaniem.

Analiza występowania specyficznych przeciwciał IgG przeciwko podanym w szczepionce epitopom CD, wykazała, że użycie NAC pozwoliło na uzyskanie wysokiego miana tych przeciwciał. Co ciekawe, odpowiedź na szczepionkę donosową była dużo bardziej specyficzna względem koniugatów niż w przypadku szczepienia domięśniowego. Szczepienie domięśniowe skutkowało bardzo wysokim mianem przeciwciał specyficznych względem białka nośnikowego KLH, które wręcz maskowały odpowiedź na epitopy. Podobny wynik uzyskano zarówno dla grup szczepionych domięśniowo koniugatami w NAC, jak i koniugatami w alum, co wydaje się dyskwalifikować podanie domięśniowe szczepionki zawierającej koniugaty z KLH. Być może wyjaśnieniem niskiej odpowiedzi względem peptydów obsadzonych na koniugatach w podaniu domięśniowym może być słabe obsadzenie KLH tymi peptydami. Koniugacja została przeprowadzona w laboratorium z użyciem komercyjnego zestawu, a określenie dokładnego stosunku liczby skoniugowanych epitopów do cząsteczki KLH okazało się niemożliwe do wykonania. Nie tłumaczy to jednak zupełnie innej odpowiedzi na te same koniugaty podane w NAC donosowo. Być może antygeny pobierane z światła jamy nosowej ulegają zupełnie innym mechanizmom obróbki niż antygeny podane domięśniowo. Może świadczyć o tym również parametr określający napływ komórek odpornościowych do śledziony. W przypadku podania donosowego protoszczepionki masa śledziony w stosunku do masy myszy nie uległa żadnym zmianom. W przypadku szczepienia domięśniowego taka zmiana była widoczna. Nie znaleziono podobnych doniesień w literaturze. Należy zbadać ewentualny udział NAC w tym procesie.

Najciekawsze wydają się być jednak wyniki dotyczące wytwarzania, specyficznych względem epitopów zawartych w koniugacie, przeciwciał IgA. Żadna z formułacji podanych domięśniowo nie wywołała produkcji specyficznych przeciwciał IgA w surowicy. Wszystkie trzy formułacje oparte o NAC podane donosowo indukowały

specyficzne przeciwciała IgA, z których NAC7 wydaje się być najbardziej efektywny. Jednocześnie, odpowiedź na nośnik, czyli białko KLH, była równa poziomowi kontroli, czyli grupy myszy szczepionych PBS. Dotychczas nie zostało to opisane w literaturze i świadczy o doskonałych właściwościach aplikacyjnych NAC jako adiuwantów w szczepionkach dośluzówkowych.

Podsumowując, badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie nie tylko pozwoliły na opracowanie konkretnych rozwiązań w kwestii zakażeń CD, ale i otwierają nowe drogi badań. Prace zapoczątkowane w tej pracy doktorskiej będą kontynuowane. Obecnie trwa zabezpieczanie własności intelektualnej dotyczącej nanoadiuwantów oraz poszukiwanie inwestora, który byłby zainteresowany włączeniem do swojego portfolio uzyskanych przez nas protoszczepionek lub samych nanoadiuwantów.

9. Wnioski

1. Cwp22 jest nowym białkiem immunoreaktywnym bakterii CD. Przeciwciała specyficzne względem białka Cwp22 znajdują się zarówno w surowicy pacjentów z CDI, osób bez historii CDI (zdrowi wolontariusze), jak i w surowicy krwi pępowinowej.
2. Specyficzne przeciwciała względem białka Cwp22 bakterii CD występują w większym mianie w surowicy krwi pępowinowej niż w surowicy zdrowych wolontariuszy, co może świadczyć o szczególnych właściwościach ochronnych przeciwciał obecnych w surowicy krwi pępowinowej.
3. Zidentyfikowano i scharakteryzowano trzy nowe epitopy białka Cwp22 bakterii CD, które mogą być zastosowane w szczepionkach. Są to: ⁵⁴EFRVAT⁵⁹, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷.
4. Koniugaty składające się z epitopów ⁵⁴EFRVAT⁵⁹, ²⁰¹KVNGKM²⁰⁶ i ²⁶⁸WQEKNGKKYY²⁷⁷ i białka nośnikowego KLH w połączeniu z nanoadiuwantem są immunogenne.
5. Właściwości fizykochemiczne uzyskanych 13 nanoadiuwantów są zróżnicowane.
6. NAC3, 7 i 13 cechują się właściwościami pożądanymi dla adiuwantów dośluzówkowych: wykazują bioadhezję, stabilnie wiążą białkowy antygen, indukują jego pobór przez komórki dendrytyczne i są bezpieczne w podaniu donosowym.
7. NAC3, 7 i 13 wykazują działanie adiuwantowe w testach *in vivo*.
8. Nanoadiuwanty są szczególnie efektywne w podaniu donosowym. Szczepienie protoszczepionką zawierającą NAC i koniugaty wywołało specyficzną odpowiedź zarówno w postaci przeciwciał klasy IgG jak i IgA skierowanym przeciwko badanym epitopom.

10. Bibliografia

- [1] P. Brandtzaeg, I.N. Farstad, G. Haraldsen, F.L. Jahnsen, Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity., *Dev Biol Stand.* 92 (1998) 93–108.
- [2] C. Czerkinsky, J. Holmgren, Mucosal Delivery Routes for Optimal Immunization: Targeting Immunity to the Right Tissues, in: P.A. Kozlowski (Ed.), *Mucosal Vaccines: Modern Concepts, Strategies, and Challenges*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012: pp. 1–18. https://doi.org/10.1007/82_2010_112.
- [3] C. Czerkinsky, F. Anjueie, J.R. McGhee, A. Geige-Chundy, J. Holmgren, M.-P. Kieny, K. Fujiyashi, J.F. Mestecky, V. Pierrefite-Carle, C. Rusk, J.-B. Sun, Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development, *Immunological Reviews.* 170 (1999) 197–222. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01339.x>.
- [4] J. Mestecky, The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions, *Journal of Clinical Immunology.* 7 (1987) 265–276. <https://doi.org/10.1007/BF00915547>.
- [5] T. Ayabe, D.P. Satchell, C.L. Wilson, W.C. Parks, M.E. Selsted, A.J. Ouellette, Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria, *Nature Immunology.* 1 (2000) 113–118. <https://doi.org/10.1038/77783>.
- [6] *Mucosal Immunology*, Elsevier, 2005. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-491543-5.X5000-1>.
- [7] P. Brandtzaeg, E.S. Baekkevold, I.N. Farstad, F.L. Jahnsen, F.-E. Johansen, E.M. Nilsen, T. Yamanaka, Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?, *Immunology Today.* 20 (1999) 141–151. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01413-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01413-3).
- [8] A.D. O’leary, E.C. Sweeney, Lymphoglandular complexes of the colon: structure and distribution, *Histopathology.* 10 (1986) 267–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1986.tb02481.x>.
- [9] M.R. Neutra, N.J. Mantis, J.-P. Kraehenbuhl, Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues, *Nature Immunology.* 2 (2001) 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/ni1101-1004>.
- [10] A. Iwasaki, B.L. Kelsall, Localization of Distinct Peyer’s Patch Dendritic Cell Subsets and Their Recruitment by Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (Mip)-3 α , Mip-3 β , and Secondary Lymphoid Organ Chemokine, *Journal of Experimental Medicine.* 191 (2000) 1381–1394. <https://doi.org/10.1084/jem.191.8.1381>.
- [11] V.K. Shreedhar, B.L. Kelsall, M.R. Neutra, Cholera Toxin Induces Migration of Dendritic Cells from the Subepithelial Dome Region to T- and B-Cell Areas of Peyer’s Patches, *Infection and Immunity.* 71 (2003) 504–509. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.504-509.2003>.
- [12] O. Joffre, M.A. Nolte, R. Spörri, C.R. e Sousa, Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity, *Immunological Reviews.* 227 (2009) 234–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x>.
- [13] P.G. Holt, M.A. Schon-Hegrad, P.G. McMenamin, Dendritic Cells in the Respiratory Tract, *International Reviews of Immunology.* 6 (1990) 139–149. <https://doi.org/10.3109/08830189009056625>.
- [14] G.G. MacPherson, L.M. Liu, Dendritic Cells and Langerhans Cells in the Uptake of Mucosal Antigens, in: J.-P. Kraehenbuhl, M.R. Neutra (Eds.), *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1999: pp. 33–53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59951-4_3.
- [15] A.B. Hutchings, A. Helander, K.J. Silvey, K. Chandran, W.T. Lucas, M.L. Nibert, M.R. Neutra, Secretory Immunoglobulin A Antibodies against the σ 1 Outer Capsid Protein of Reovirus Type 1 Lang Prevent Infection of Mouse Peyer’s Patches, *Journal of Virology.* 78 (2004) 947–957. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.947-957.2004>.

- [16] M. van Egmond, C.A. Damen, A.B. van Spriel, G. Vidarsson, E. van Garderen, J.G.J. van de Winkel, IgA and the IgA Fc receptor, *Trends in Immunology*. 22 (2001) 205–211. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01873-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01873-7).
- [17] P.A. Kozlowski, S.B. Williams, R.M. Lynch, T.P. Flanigan, R.R. Patterson, S. Cu-Uvin, M.R. Neutra, Differential Induction of Mucosal and Systemic Antibody Responses in Women After Nasal, Rectal, or Vaginal Immunization: Influence of the Menstrual Cycle, *The Journal of Immunology*. 169 (2002) 566–574. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.566>.
- [18] P.A. Kozlowski, R.M. Lynch, R.R. Patterson, S. Cu-Uvin, T.P. Flanigan, M.R. Neutra, Modified wick method using Weck-Cel sponges for collection of human rectal secretions and analysis of mucosal HIV antibody., *J Acquir Immune Defic Syndr*. 24 (2000) 297–309. <https://doi.org/10.1097/00126334-200008010-00001>.
- [19] F. van Ginkel, Vaccines for Mucosal Immunity to Combat Emerging Infectious Diseases, *Emerging Infectious Diseases*. 6 (2000) 123–132. <https://doi.org/10.3201/eid0602.000204>.
- [20] F.V. Chisari, Cytotoxic T cells and viral hepatitis., *Journal of Clinical Investigation*. 99 (1997) 1472–1477. <https://doi.org/10.1172/JCI119308>.
- [21] T.A. Fehniger, G. Herbein, H. Yu, M.I. Para, Z.P. Bernstein, W.A. O'Brien, M.A. Caligiuri, Natural Killer Cells from HIV-1+ Patients Produce C-C Chemokines and Inhibit HIV-1 Infection, *The Journal of Immunology*. 161 (1998) 6433–6438.
- [22] S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis, *Cell*. 118 (2004) 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.
- [23] F. Backhed, Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine, *Science*. 307 (2005) 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>.
- [24] C.C. Whitacre, New insights into oral tolerance, *Gastroenterology*. 119 (2000) 260–262. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.9192>.
- [25] K.A. Woodrow, K.M. Bennett, D.D. Lo, Mucosal Vaccine Design and Delivery, *Annual Review of Biomedical Engineering*. 14 (2012) 17–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150054>.
- [26] D. Melamed, A. Friedman, Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin, *European Journal of Immunology*. 23 (1993) 935–942. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230426>.
- [27] Y. Chen, J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V.K. Kuchroo, H.L. Weiner, Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance, *Nature*. 376 (1995) 177. <https://doi.org/10.1038/376177a0>.
- [28] A. Miller, O. Lider, H.L. Weiner, Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens., *Journal of Experimental Medicine*. 174 (1991) 791–798. <https://doi.org/10.1084/jem.174.4.791>.
- [29] G.F. Hoyne, R.E. O'Hehir, D.C. Wraith, W.R. Thomas, J.R. Lamb, Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice., *Journal of Experimental Medicine*. 178 (1993) 1783–1788. <https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1783>.
- [30] C. McMenamin, P.G. Holt, The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production., *Journal of Experimental Medicine*. 178 (1993) 889–899. <https://doi.org/10.1084/jem.178.3.889>.
- [31] G. Kraal, D.A. Wolvers, Regulation of immunological mucosal tolerance, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 49 Suppl 1 (2001) S1-6.
- [32] A. Jarzab, M. Skowicki, D. Witkowska, [Subunit vaccines--antigens, carriers, conjugation methods and the role of adjuvants]., *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 67 (2013) 1128–1143. <https://doi.org/10.5604/17322693.1077807>.
- [33] Wszystko o szczepieniach, *Szczepienia.Info*. (n.d.). <http://szczepienia.pzh.gov.pl/wszystko-o-szczepieniach/> (accessed July 16, 2019).
- [34] M.E. Lamm, Interaction of Antigens and Antibodies at Mucosal Surfaces, *Annual Review*

- of Microbiology. 51 (1997) 311–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.311>.
- [35] J.-P. Amorij, W.L. Hinrichs, H.W. Frijlink, J.C. Wilschut, A. Huckriede, Needle-free influenza vaccination, *The Lancet Infectious Diseases*. 10 (2010) 699–711. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70157-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70157-2).
- [36] M.M. Levine, G. Dougan, Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces, *The Lancet*. 351 (1998) 1375–1376. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79439-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79439-3).
- [37] J.D. Clements, L.C. Freytag, Parenteral Vaccination Can Be an Effective Means of Inducing Protective Mucosal Responses, *Clinical and Vaccine Immunology*. 23 (2016) 438–441. <https://doi.org/10.1128/CVI.00214-16>.
- [38] A. Rudin, G.C. Riise, J. Holmgren, Antibody Responses in the Lower Respiratory Tract and Male Urogenital Tract in Humans after Nasal and Oral Vaccination with Cholera Toxin B Subunit, *Infection and Immunity*. 67 (1999) 2884–2890.
- [39] H.F. Staats, S.P. Montgomery, T.J. Palker, Intranasal Immunization Is Superior to Vaginal, Gastric, or Rectal Immunization for the Induction of Systemic and Mucosal Anti-HIV Antibody Responses, *AIDS Research and Human Retroviruses*. 13 (1997) 945–952. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.945>.
- [40] K. Imaoka, C.J. Miller, M. Kubota, M.B. McChesney, B. Lohman, M. Yamamoto, K. Fujihashi, K. Someya, M. Honda, J.R. McGhee, H. Kiyono, Nasal Immunization of Nonhuman Primates with Simian Immunodeficiency Virus p55gag and Cholera Toxin Adjuvant Induces Th1/Th2 Help for Virus-Specific Immune Responses in Reproductive Tissues, *The Journal of Immunology*. 161 (1998) 5952–5958.
- [41] N. Lycke, Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations, *Nature Reviews Immunology*. 12 (2012) 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>.
- [42] M.F. Pasetti, J.K. Simon, M.B. Sztein, M.M. Levine, Immunology of gut mucosal vaccines, *Immunological Reviews*. 239 (2011) 125–148. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00970.x>.
- [43] A.B. Sabin, Oral Poliovirus Vaccine: History of Its Development and Use and Current Challenge to Eliminate Poliomyelitis from the World, *J Infect Dis*. 151 (1985) 420–436. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.3.420>.
- [44] W. Domm, L. Brooks, H.L. Chung, C. Feng, W.J. Bowers, G. Watson, J.L. McGrath, S. Dewhurst, Robust antigen-specific humoral immune responses to sublingually delivered adenoviral vectors encoding HIV-1 Env: Association with mucoadhesion and efficient penetration of the sublingual barrier, *Vaccine*. 29 (2011) 7080–7089. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.008>.
- [45] H.-J. Cho, J.-Y. Kim, Y. Lee, J.M. Kim, Y.B. Kim, T. Chun, Y.-K. Oh, Enhanced humoral and cellular immune responses after sublingual immunization against human papillomavirus 16 L1 protein with adjuvants, *Vaccine*. 28 (2010) 2598–2606. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.013>.
- [46] J.R. Carmichael, S. Pal, D. Tifrea, L.M. de la Maza, Induction of protection against vaginal shedding and infertility by a recombinant Chlamydia vaccine, *Vaccine*. 29 (2011) 5276–5283. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.013>.
- [47] D.G. Koutsonanos, M. del P. Martin, V.G. Zarnitsyn, S.P. Sullivan, R.W. Compans, M.R. Prausnitz, I. Skountzou, Transdermal Influenza Immunization with Vaccine-Coated Microneedle Arrays, *PLOS ONE*. 4 (2009) e4773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004773>.
- [48] I.M. Belyakov, M.A. Derby, J.D. Ahlers, B.L. Kelsall, P. Earl, B. Moss, W. Strober, J.A. Berzofsky, Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge, *PNAS*. 95 (1998) 1709–1714. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1709>.
- [49] A.L. Man, M.E. Prieto-Garcia, C. Nicoletti, Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys?, *Immunology*. 113 (2004) 15–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01964.x>.
- [50] M.R. Neutra, P.A. Kozlowski, Mucosal vaccines: the promise and the challenge, *Nature Reviews Immunology*. 6 (2006) 148–158. <https://doi.org/10.1038/nri1777>.

- [51] C. Czerkinsky, N. Çuburu, M.-N. Kweon, F. Anjuere, J. Holmgren, Sublingual vaccination, *Human Vaccines*. 7 (2011) 110–114. <https://doi.org/10.4161/hv.7.1.13739>.
- [52] C.-F. Flach, N. Svensson, M. Blomquist, A. Ekman, S. Raghavan, J. Holmgren, A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against *Helicobacter pylori*, *Vaccine*. 29 (2011) 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.088>.
- [53] K. Ita, Transdermal delivery of vaccines – Recent progress and critical issues, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 83 (2016) 1080–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.026>.
- [54] I. Jabbal-Gill, Nasal vaccine innovation, *Journal of Drug Targeting*. 18 (2010) 771–786. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.523790>.
- [55] N.J. Carter, M.P. Curran, Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™), *Drugs*. 71 (2011) 1591–1622. <https://doi.org/10.2165/11206860-000000000-00000>.
- [56] D. Tribble, R. Kaminski, J. Cantrell, M. Nelson, C. Porter, S. Baqar, C. Williams, R. Arora, J. Saunders, M. Ananthakrishnan, J. Sanders, G. Zaucha, R. Turbyfill, E. Oaks, Safety and immunogenicity of a *Shigella flexneri* 2a Invaplex 50 intranasal vaccine in adult volunteers, *Vaccine*. 28 (2010) 6076–6085. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.086>.
- [57] L. Mayer, L. Shao, Therapeutic potential of oral tolerance, *Nature Reviews Immunology*. 4 (2004) 407–419. <https://doi.org/10.1038/nri1370>.
- [58] R. Edelman, Vaccine Adjuvants, *Clinical Infectious Diseases*. 2 (1980) 370–383. <https://doi.org/10.1093/clinids/2.3.370>.
- [59] J.C. Cox, A.R. Coulter, Adjuvants—a classification and review of their modes of action, *Vaccine*. 15 (1997) 248–256. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00183-1).
- [60] S. Lee, M.T. Nguyen, Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases, *Immune Network*. 15 (2015) 51–57. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>.
- [61] J.O. Naim, C.J. van Oss, W. Wu, R.F. Giese, P.A. Nickerson, Mechanisms of adjuvancy: I—metal oxides as adjuvants, *Vaccine*. 15 (1997) 1183–1193. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00016-9).
- [62] E. Tritto, F. Mosca, E. De Gregorio, Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants, *Vaccine*. 27 (2009) 3331–3334. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.084>.
- [63] B.N. Lambrecht, M. Kool, M.A. Willart, H. Hammad, Mechanism of action of clinically approved adjuvants, *Current Opinion in Immunology*. 21 (2009) 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.004>.
- [64] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*. 392 (1998) 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>.
- [65] T. Sornasse, V. Flamand, G.D. Becker, H. Bazin, F. Tielemans, K. Thielemans, J. Urbain, O. Leo, M. Moser, Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo., *Journal of Experimental Medicine*. 175 (1992) 15–21. <https://doi.org/10.1084/jem.175.1.15>.
- [66] A. Bernard, L. Lamy, I. Alberti, THE TWO-SIGNAL MODEL OF T-CELL ACTIVATION AFTER 30 YEARS, *Transplantation*. 73 (2002) S31.
- [67] J. Kober, J. Leitner, C. Klauser, R. Woitek, O. Majdic, J. Stöckl, D. Herndler-Brandstetter, B. Grubeck-Loebenstein, B.M. Reipert, W.F. Pickl, K. Pfistershammer, P. Steinberger, The capacity of the TNF family members 4-1BBL, OX40L, CD70, GITRL, CD30L and LIGHT to costimulate human T cells, *European Journal of Immunology*. 38 (2008) 2678–2688. <https://doi.org/10.1002/eji.200838250>.
- [68] C.D. Gimmi, G.J. Freeman, J.G. Gribben, G. Gray, L.M. Nadler, Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation, *PNAS*. 90 (1993) 6586–6590. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6586>.
- [69] G.E. Kaiko, J.C. Horvat, K.W. Beagley, P.M. Hansbro, Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?, *Immunology*. 123 (2008) 326–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x>.
- [70] W. Kratky, C.R. e Sousa, A. Oxenius, R. Spörri, Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+ T-cell priming and tumor vaccination, *PNAS*. 108 (2011) 17414–17419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108945108>.
- [71] B. Eksteen, J.R. Mora, E.L. Houghton, N.C. Henderson, L. Lee–Turner, E.J. Villablanca, S.M. Curbishley, A.I. Aspinall, U.H. von Andrian, D.H. Adams, Gut Homing Receptors on

- CD8 T Cells Are Retinoic Acid Dependent and Not Maintained by Liver Dendritic or Stellate Cells, *Gastroenterology*. 137 (2009) 320–329. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.046>.
- [72] H. Sigmundsdottir, J. Pan, G.F. Debes, C. Alt, A. Habtezion, D. Soler, E.C. Butcher, DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27, *Nature Immunology*. 8 (2007) 285–293. <https://doi.org/10.1038/ni1433>.
- [73] J. Ann, M. Samant, C. Rheau, C. Dumas, E. Beaulieu, A. Morasse, C. Mallett, M.-E. Hamelin, B. Papadopoulou, G. Boivin, Adjuvanted inactivated influenza A(H3N2) vaccines induce stronger immunogenicity in mice and confer higher protection in ferrets than unadjuvanted inactivated vaccines, *Vaccine*. 32 (2014) 5730–5739. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.029>.
- [74] S.G. Reed, M.T. Orr, C.B. Fox, Key roles of adjuvants in modern vaccines, *Nature Medicine*. 19 (2013) 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>.
- [75] S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nature Immunology*. 2 (2001) 675–680. <https://doi.org/10.1038/90609>.
- [76] S. Mathew, A. Lendlein, C. Wischke, Characterization of protein-adjuvant coencapsulation in microparticles for vaccine delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 87 (2014) 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.04.003>.
- [77] C.K. Fraser, K.R. Diener, M.P. Brown, J.D. Hayball, Improving vaccines by incorporating immunological adjuvants, *Expert Review of Vaccines*. 6 (2007) 559–578. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.4.559>.
- [78] E.J. Ryan, E. McNeela, G.A. Murphy, H. Stewart, D. O’hagan, M. Pizza, R. Rappuoli, K.H.G. Mills, Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells, *Infection and Immunity*. 67 (1999) 6270–6280.
- [79] H. Jakobsen, D. Schulz, M. Pizza, R. Rappuoli, I. Jónsdóttir, Intranasal Immunization with Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccines with Nontoxic Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxins as Adjuvants Protects Mice against Invasive Pneumococcal Infections, *Infection and Immunity*. 67 (1999) 5892–5897.
- [80] J.A. Neidleman, M. Vajdy, M. Ugozzoli, G. Ott, D. O’hagan, Genetically detoxified mutants of heat-labile enterotoxin from Escherichia coli are effective adjuvants for induction of cytotoxic T-cell responses against HIV-1 gag-p55, *Immunology*. 101 (2000) 154–160. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00090.x>.
- [81] J. Sánchez, J. Holmgren, Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea, *Current Opinion in Immunology*. 17 (2005) 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.007>.
- [82] J. Holmgren, C. Czerkinsky, Mucosal immunity and vaccines, *Nature Medicine*. 11 (2005) S45–S53. <https://doi.org/10.1038/nm1213>.
- [83] A. M. Harandi, D. Medaglini, Mucosal Adjuvants, (2010). <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/chr/2010/00000008/00000004/art00007> (accessed April 5, 2019).
- [84] S.H. Blaas, M. Stieber-Gunckel, W. Falk, F. Obermeier, G. Rogler, CpG-oligodeoxynucleotides stimulate immunoglobulin A secretion in intestinal mucosal B cells, *Clinical & Experimental Immunology*. 155 (2009) 534–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03855.x>.
- [85] S. Uematsu, K. Fujimoto, M.H. Jang, B.-G. Yang, Y.-J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, H. Kiyono, M. Miyasaka, K.J. Ishii, S. Akira, Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5, *Nature Immunology*. 9 (2008) 769–776. <https://doi.org/10.1038/ni.1622>.
- [86] P.N. Boyaka, M. Marinaro, R.J. Jackson, F.W. van Ginkel, E. Cormet-Boyaka, K.L. Kirk, C.R. Kensil, J.R. McGhee, Oral QS-21 Requires Early IL-4 Help for Induction of Mucosal and Systemic Immunity, *The Journal of Immunology*. 166 (2001) 2283–2290.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2283>.
- [87] D. Christensen, E.M. Agger, L.V. Andreasen, D. Kirby, P. Andersen, Y. Perrie, Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future, *Journal of Liposome Research*. 19 (2009) 2–11. <https://doi.org/10.1080/08982100902726820>.
- [88] R.K. Gupta, G.R. Siber, Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects, *Vaccine*. 13 (1995) 1263–1276. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00011-O](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00011-O).
- [89] F.M. Davenport, A.V. Hennessy, F.B. Askin, Lack of adjuvant effect of AIPO₄ on purified influenza virus hemagglutinins in man, *J. Immunol.* 100 (1968) 1139–1140.
- [90] J. Holmgren, C. Czerkinsky, K. Eriksson, A. Mharandi, Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges, *Vaccine*. 21 (2003) S89–S95. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00206-8).
- [91] L.C. Freytag, J.D. Clements, Mucosal adjuvants, *Vaccine*. 23 (2005) 1804–1813. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.010>.
- [92] S.G. Reed, S. Bertholet, R.N. Coler, M. Friede, New horizons in adjuvants for vaccine development, *Trends in Immunology*. 30 (2009) 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>.
- [93] K. Eriksson, J. Holmgren, Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants, *Current Opinion in Immunology*. 14 (2002) 666–672. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00384-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00384-9).
- [94] T. Jones, S. Cyr, F. Allard, N. Bellerose, G.H. Lowell, D.S. Burt, Protollin™: a novel adjuvant for intranasal vaccines, *Vaccine*. 22 (2004) 3691–3697. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.035>.
- [95] M.S. Duthie, H.P. Windish, C.B. Fox, S.G. Reed, Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines, *Immunological Reviews*. 239 (2011) 178–196. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00978.x>.
- [96] R.L. Coffman, A. Sher, R.A. Seder, Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work, *Immunity*. 33 (2010) 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>.
- [97] C.R. Kensil, J.-Y. Wu, S. Soltysik, Structural and Immunological Characterization of the Vaccine Adjuvant QS-21, in: M.F. Powell, M.J. Newman (Eds.), *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Springer US, Boston, MA, 1995: pp. 525–541. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5_22.
- [98] S.K. Mallapragada, B. Narasimhan, Immunomodulatory biomaterials, *International Journal of Pharmaceutics*. 364 (2008) 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.06.030>.
- [99] S. Chadwick, C. Kriegel, M. Amiji, Nanotechnology solutions for mucosal immunization, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62 (2010) 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.012>.
- [100] C.R. Alving, Liposomes as carriers of antigens and adjuvants, *Journal of Immunological Methods*. 140 (1991) 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90120-5).
- [101] N. K. Garg, S. Mangal, H. Khambete, P. K. Sharma, R. K. Tyagi, Mucosal Delivery of Vaccines: Role of Mucoadhesive/Biodegradable Polymers, (2010). <https://doi.org/info:doi/10.2174/187221110791185015>.
- [102] J.M. Kyd, A.R. Foxwell, A.W. Cripps, Mucosal immunity in the lung and upper airway, *Vaccine*. 19 (2001) 2527–2533. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00484-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00484-9).
- [103] M.R. Szewczuk, R.J. Campbell, L.K. Jung, Lack of age-associated immune dysfunction in mucosal-associated lymph nodes., *The Journal of Immunology*. 126 (1981) 2200–2204.
- [104] N.L. Tilney, Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat., *J Anat.* 109 (1971) 369–383.
- [105] M. Kaliner, Z. Marom, C. Patow, J. Shelhamer, Human respiratory mucus, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 73 (1984) 318–323. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(84\)90403-2](https://doi.org/10.1016/0091-6749(84)90403-2).
- [106] D.F. Proctor, The Upper Airways, *Am Rev Respir Dis*. 115 (1977) 97–129. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.115.1.97>.
- [107] P. Satir, M.A. Sleight, The Physiology of Cilia and Mucociliary Interactions, *Annual Review of Physiology*. 52 (1990) 137–155. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.001033>.

- [108] M.I. Ugwoke, N. Verbeke, R. Kinget, The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53 (2001) 3–22. <https://doi.org/10.1211/0022357011775145>.
- [109] B. Slütter, N. Hagens, W. Jiskoot, Rational design of nasal vaccines, *Journal of Drug Targeting*. 16 (2008) 1–17. <https://doi.org/10.1080/10611860701637966>.
- [110] G.J. Strous, J. Dekker, Mucin-Type Glycoproteins, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 27 (1992) 57–92. <https://doi.org/10.3109/10409239209082559>.
- [111] P. Roussel, G. Lamblin, M. Lhermitte, N. Houdret, J.-J. Lafitte, J.-M. Perini, A. Klein, A. Scharfman, The complexity of mucins, *Biochimie*. 70 (1988) 1471–1482. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90284-2](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90284-2).
- [112] G.S. Asane, S.A. Nirmal, K.B. Rasal, A.A. Naik, M.S. Mahadik, Y.M. Rao, Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 34 (2008) 1246–1266. <https://doi.org/10.1080/03639040802026012>.
- [113] V. Grabovac, D. Guggi, A. Bernkop-Schnürch, Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (2005) 1713–1723. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.006>.
- [114] L. Illum, Nanoparticulate Systems for Nasal Delivery of Drugs: A Real Improvement over Simple Systems?, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96 (2007) 473–483. <https://doi.org/10.1002/jps.20718>.
- [115] P.J. Giannasca, J.A. Boden, T.P. Monath, Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell-directed lectins., *Infection and Immunity*. 65 (1997) 4288–4298.
- [116] P. Tyrer, A.R. Foxwell, A.W. Cripps, M.A. Apicella, J.M. Kyd, Microbial Pattern Recognition Receptors Mediate M-Cell Uptake of a Gram-Negative Bacterium, *Infection and Immunity*. 74 (2006) 625–631. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.625-631.2006>.
- [117] E. Gullberg, Å.V. Keita, S.Y. Salim, M. Andersson, K.D. Caldwell, J.D. Söderholm, P. Artursson, Identification of Cell Adhesion Molecules in the Human Follicle-Associated Epithelium That Improve Nanoparticle Uptake into the Peyer's Patches, *J Pharmacol Exp Ther*. 319 (2006) 632–639. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.107847>.
- [118] M.J. Pearce, D. Drane, ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (2005) 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.006>.
- [119] T. Daemen, A. de Mare, L. Bungener, J. de Jonge, A. Huckriede, J. Wilschut, Virosomes for antigen and DNA delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (2005) 451–463. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.005>.
- [120] P.T. Wong, S.H. Wang, S. Ciotti, P.E. Makidon, D.M. Smith, Y. Fan, C.F. Schuler, J.R. Baker, Formulation and Characterization of Nanoemulsion Intranasal Adjuvants: Effects of Surfactant Composition on Mucoadhesion and Immunogenicity, *Molecular Pharmaceutics*. 11 (2014) 531–544. <https://doi.org/10.1021/mp4005029>.
- [121] A.U. Bielinska, P.E. Makidon, K.W. Janczak, L.P. Blanco, B. Swanson, D.M. Smith, T. Pham, Z. Szabo, J.F. Kukowska-Latallo, J.R. Baker, Distinct Pathways of Humoral and Cellular Immunity Induced with the Mucosal Administration of a Nanoemulsion Adjuvant, *The Journal of Immunology*. 192 (2014) 2722–2733. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301424>.
- [122] P.E. Makidon, A.U. Bielinska, S.S. Nigavekar, K.W. Janczak, J. Knowlton, A.J. Scott, N. Mank, Z. Cao, S. Rathinavelu, M.R. Beer, J.E. Wilkinson, L.P. Blanco, J.J. Landers, J.R. Baker, Pre-Clinical Evaluation of a Novel Nanoemulsion-Based Hepatitis B Mucosal Vaccine, *PLoS ONE*. 3 (2008) e2954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002954>.
- [123] P.A. Lawson, D.M. Citron, K.L. Tyrrell, S.M. Finegold, Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938, *Anaerobe*. 40 (2016) 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>.
- [124] F. Barbut, J.C. Petit, Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections, *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (2001) 405–410.
- [125] J.Y. Chang, D.A. Antonopoulos, A. Kalra, A. Tonelli, W.T. Khalife, T.M. Schmidt, V.B. Young, Decreased Diversity of the Fecal Microbiome in Recurrent *Clostridium difficile* – Associated Diarrhea, *The Journal of Infectious Diseases*. 197 (2008) 435–438.

- <https://doi.org/10.1086/525047>.
- [126] C.P. Kelly, Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection?: Predictors of *C. difficile* recurrence, *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (2012) 21–27. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12046>.
- [127] M. Thelestam, E. Chaves-Olarte, Cytotoxic Effects of the *Clostridium difficile* Toxins, in: K. Aktories, T.D. Wilkins (Eds.), *Clostridium Difficile*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2000: pp. 85–96. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06272-2_4.
- [128] M. Rupnik, M.H. Wilcox, D.N. Gerding, *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis, *Nature Reviews Microbiology*. 7 (2009) 526–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>.
- [129] N.H. Zaiß, W. Witte, U. Nübel, Fluoroquinolone Resistance and *Clostridium difficile*, Germany, *Emerging Infectious Diseases*. 16 (2010) 675–677. <https://doi.org/10.3201/eid1604.090859>.
- [130] J.S. Huang, Z.-D. Jiang, K.W. Garey, T. Lasco, H.L. DuPont, Use of Rifamycin Drugs and Development of Infection by Rifamycin-Resistant Strains of *Clostridium difficile*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (2013) 2690–2693. <https://doi.org/10.1128/AAC.00548-13>.
- [131] G. Martirosian, W. Hryniewicz, T. Ozorowski, K. Pawlik, A. Deptuła, Zakażenia *Clostridioides (Clostridium) difficile*: epidemiologia, diagnostyka, terapia, profilaktyka, Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2018.
- [132] E. Gough, H. Shaikh, A.R. Manges, Systematic Review of Intestinal Microbiota Transplantation (Fecal Bacteriotherapy) for Recurrent *Clostridium difficile* Infection, *Clin Infect Dis*. 53 (2011) 994–1002. <https://doi.org/10.1093/cid/cir632>.
- [133] J. Aas, C.E. Gessert, J.S. Bakken, Recurrent *Clostridium difficile* Colitis: Case Series Involving 18 Patients Treated with Donor Stool Administered via a Nasogastric Tube, *Clin Infect Dis*. 36 (2003) 580–585. <https://doi.org/10.1086/367657>.
- [134] A. Cassini, D. Plachouras, T. Eckmanns, M.A. Sin, H.-P. Blank, T. Ducomble, S. Haller, T. Harder, A. Klingeberg, M. Sixtensson, E. Velasco, B. Weiß, P. Kramarz, D.L. Monnet, M.E. Kretzschmar, C. Suetens, Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study, *PLOS Medicine*. 13 (2016) e1002150. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002150>.
- [135] M.P. Bauer, D. Veenendaal, L. Verhoef, P. Bloembergen, J.T.V. Dissel, E.J. Kuijper, Clinical and microbiological characteristics of community-onset *Clostridium difficile* infection in The Netherlands, *Clinical Microbiology and Infection*. 15 (2009) 1087–1092. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02853.x>.
- [136] M.H. Wilcox, L. Mooney, R. Bendall, C.D. Settle, W.N. Fawley, A case–control study of community-associated *Clostridium difficile* infection, *J Antimicrob Chemother*. 62 (2008) 388–396. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn163>.
- [137] K.A. Davies, C.M. Longshaw, G.L. Davis, E. Bouza, F. Barbut, Z. Barna, M. Delmée, F. Fitzpatrick, K. Ivanova, E. Kuijper, I.S. Macovei, S. Mentula, P. Mastrantonio, L. von Müller, M. Oleastro, E. Petinaki, H. Pituch, T. Norén, E. Nováková, O. Nyč, M. Rupnik, D. Schmid, M.H. Wilcox, Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), *The Lancet Infectious Diseases*. 14 (2014) 1208–1219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70991-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70991-0).
- [138] Biuletyny, meldunki, informacje epidemiologiczne, (n.d.). http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (accessed December 29, 2018).
- [139] H. Pituch, P. Obuch-Woszczatyński, D. Lachowicz, D. Wultańska, P. Karpiński, G. Młynarczyk, S.M. van Dorp, E.J. Kuijper, the P.C. difficile S. Group, Hospital-based *Clostridium difficile* infection surveillance reveals high proportions of PCR ribotypes 027 and 176 in different areas of Poland, 2011 to 2013, *Eurosurveillance*. 20 (2015) 30025. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.38.30025>.
- [140] M. Aptekorz, A. Szczegieliński, B. Wiechula, C. Harmanus, E. Kuijper, G. Martirosian, Occurrence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in hospitals of Silesia, Poland, *Anaerobe*.

- 45 (2017) 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.002>.
- [141] P.N. Wiegand, D. Nathwani, M.H. Wilcox, J. Stephens, A. Shelbaya, S. Haider, Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection, *Journal of Hospital Infection*. 81 (2012) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.02.004>.
- [142] E.R. Dubberke, M.A. Olsen, Burden of *Clostridium difficile* on the Healthcare System, *Clin Infect Dis*. 55 (2012) S88–S92. <https://doi.org/10.1093/cid/cis335>.
- [143] A.M. Jones, E.J. Kuijper, M.H. Wilcox, *Clostridium difficile*: A European perspective, *Journal of Infection*. 66 (2013) 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.019>.
- [144] A. Mehlich, S. Górska, A. Gamian, A. Myc, [Selected aspects of *Clostridium difficile* infection], *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 69 (2015) 598–611. <https://doi.org/10.5604/17322693.1151340>.
- [145] K.Z. Vardakas, K.A. Polyzos, K. Patouni, P.I. Rafailidis, G. Samonis, M.E. Falagas, Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 40 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.004>.
- [146] Z. Eitel, G. Terhes, J. Sóki, E. Nagy, E. Urbán, Investigation of the MICs of fidaxomicin and other antibiotics against Hungarian *Clostridium difficile* isolates, *Anaerobe*. 31 (2015) 47–49. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.002>.
- [147] J. Freeman, J. Vernon, K. Morris, S. Nicholson, S. Todhunter, C. Longshaw, M.H. Wilcox, Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group, Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, *Clin. Microbiol. Infect.* 21 (2015) 248.e9–248.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.017>.
- [148] M. Sebahia, B.W. Wren, P. Mullany, N.F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N.R. Thomson, A.P. Roberts, A.M. Cerdeño-Tárraga, H. Wang, M.T. Holden, A. Wright, C. Churcher, M.A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell, J. Parkhill, The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome, *Nature Genetics*. 38 (2006) 779–786. <https://doi.org/10.1038/ng1830>.
- [149] L.C. McDonald, G.E. Killgore, A. Thompson, R.C. Owens, S.V. Kazakova, S.P. Sambol, S. Johnson, D.N. Gerding, An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*, *New England Journal of Medicine*. 353 (2005) 2433–2441. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051590>.
- [150] E. Bouza, P. Munoz, R. Alonso, Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*, *Clinical Microbiology and Infection*. 11 (2005) 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01165.x>.
- [151] J.G. Songer, Clostridia as agents of zoonotic disease, *Veterinary Microbiology*. 140 (2010) 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.003>.
- [152] E.L. Best, W.N. Fawley, P. Parnell, M.H. Wilcox, The Potential for Airborne Dispersal of *Clostridium difficile* from Symptomatic Patients, *Clin Infect Dis*. 50 (2010) 1450–1457. <https://doi.org/10.1086/652648>.
- [153] I. Florin, M. Thelestam, Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*. 763 (1983) 383–392.
- [154] K.D. Tucker, T.D. Wilkins, Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y, *Infect. Immun.* 59 (1991) 73–78.
- [155] I. Florin, M. Thelestam, Lysosomal involvement in cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B, *Microb. Pathog.* 1 (1986) 373–385.
- [156] I. Just, J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann, K. Aktories, Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B, *Nature*. 375 (1995) 500–503. <https://doi.org/10.1038/375500a0>.
- [157] E. Chaves-Olarte, M. Weidmann, C. Eichel-Streiber, M. Thelestam, Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate

- specificities, and surface binding to cultured cells, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1734–1741. <https://doi.org/10.1172/JCI119698>.
- [158] B.A. Feltis, S.M. Wiesner, A.S. Kim, S.L. Erlandsen, D.L. Lyerly, T.D. Wilkins, C.L. Wells, Clostridium difficile toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes, *Shock*. 14 (2000) 629–634.
- [159] M.H. Souza, A.A. Melo-Filho, M.F. Rocha, D.M. Lyerly, F.Q. Cunha, A.A. Lima, R.A. Ribeiro, The involvement of macrophage-derived tumour necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by Clostridium difficile toxin B, *Immunology*. 91 (1997) 281–288.
- [160] Y.R. Mahida, S. Makh, S. Hyde, T. Gray, S.P. Borriello, Effect of Clostridium difficile toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment., *Gut*. 38 (1996) 337–347. <https://doi.org/10.1136/gut.38.3.337>.
- [161] G.M. Calderón, J. Torres-López, T.-J. Lin, B. Chavez, M. Hernández, O. Muñoz, A.D. Befus, J.A. Enciso, Effects of Toxin A from Clostridium difficile on Mast Cell Activation and Survival, *Infection and Immunity*. 66 (1998) 2755–2761.
- [162] C. Frädrieh, L.-A. Beer, R. Gerhard, Reactive Oxygen Species as Additional Determinants for Cytotoxicity of Clostridium difficile Toxins A and B, *Toxins*. 8 (2016) 25. <https://doi.org/10.3390/toxins8010025>.
- [163] G.K.A. Meyer, A. Neetz, G. Brandes, D. Tsikas, J.H. Butterfield, I. Just, R. Gerhard, Clostridium difficile Toxins A and B Directly Stimulate Human Mast Cells, *Infection and Immunity*. 75 (2007) 3868–3876. <https://doi.org/10.1128/IAI.00195-07>.
- [164] F.L. van de Veerdonk, M.G. Netea, C.A. Dinarello, L.A.B. Joosten, Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection, *Trends in Immunology*. 32 (2011) 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.003>.
- [165] N.V. Jafari, S.A. Kuehne, C.E. Bryant, M. Elawad, B.W. Wren, N.P. Minton, E. Allan, M. Bajaj-Elliott, Clostridium difficile Modulates Host Innate Immunity via Toxin-Independent and Dependent Mechanism(s), *PLoS ONE*. 8 (2013) e69846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069846>.
- [166] M. Hasegawa, T. Yamazaki, N. Kamada, K. Tawaratsumida, Y.-G. Kim, G. Nunez, N. Inohara, Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 Mediates Recognition of Clostridium difficile and Induces Neutrophil Recruitment and Protection against the Pathogen, *The Journal of Immunology*. 186 (2011) 4872–4880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003761>.
- [167] A. Ryan, M. Lynch, S.M. Smith, S. Amu, H.J. Nel, C.E. McCoy, J.K. Dowling, E. Draper, V. O'Reilly, C. McCarthy, J. O'Brien, D. Ni Eidhin, M.J. O'Connell, B. Keogh, C.O. Morton, T.R. Rogers, P.G. Fallon, L.A. O'Neill, D. Kelleher, C.E. Loscher, A Role for TLR4 in Clostridium difficile Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins, *PLoS Pathogens*. 7 (2011) e1002076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002076>.
- [168] Y. Yoshino, T. Kitazawa, M. Ikeda, K. Tatsuno, S. Yanagimoto, S. Okugawa, H. Yotsuyanagi, Y. Ota, Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5, *Life Sciences*. 92 (2013) 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.11.017>.
- [169] J.G. Bartlett, A.B. Onderdonk, R.L. Cisneros, D.L. Kasper, Clindamycin-Associated Colitis Due to a Toxin-Producing Species of Clostridium in Hamsters, *J Infect Dis*. 136 (1977) 701–705. <https://doi.org/10.1093/infdis/136.5.701>.
- [170] G.B. al et, Distribution of Clostridium difficile variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. - PubMed - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314196?dopt=Abstract> (accessed January 8, 2019).
- [171] D.W. Burdon, R.H. George, G.A. Mogg, Y. Arabi, H. Thompson, M. Johnson, J. Alexander-Williams, M.R. Keighley, Faecal toxin and severity of antibiotic-associated pseudomembranous colitis., *Journal of Clinical Pathology*. 34 (1981) 548–551. <https://doi.org/10.1136/jcp.34.5.548>.
- [172] L. Kyne, M. Warny, A. Qamar, C.P. Kelly, Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea, *The Lancet*. 357 (2001)

- 189–193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03592-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03592-3).
- [173] G. Corthier, M.C. Muller, T.D. Wilkins, D. Lyerly, R. L'Haridon, Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A., *Infection and Immunity*. 59 (1991) 1192–1195.
- [174] S.P. Sambol, M.M. Merrigan, D. Lyerly, D.N. Gerding, S. Johnson, Toxin Gene Analysis of a Variant Strain of *Clostridium difficile* That Causes Human Clinical Disease, *Infection and Immunity*. 68 (2000) 5480–5487. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5480-5487.2000>.
- [175] D.M. Lyerly, H.C. Krivan, T.D. Wilkins, *Clostridium difficile*: its disease and toxins., *Clinical Microbiology Reviews*. 1 (1988) 1–18. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.1.1>.
- [176] H. Kato, N. Kato, K. Watanabe, N. Iwai, H. Nakamura, T. Yamamoto, K. Suzuki, S.-M. Kim, Y. Chong, E.B. Wasito, Identification of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium difficile* by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (1998) 2178–2182.
- [177] E.J. Kuijper, J. de Weerd, H. Kato, N. Kato, A.P. van Dam, E.R. van der Vorm, J. Weel, C. van Rhee, J. Dankert, Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (2001) 528–534.
- [178] M.J. Alfa, A. Kabani, D. Lyerly, S. Moncrief, L.M. Neville, A. Al-Barrak, G.K.H. Harding, B. Dyck, K. Olekson, J.M. Embil, Characterization of a Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strain of *Clostridium difficile* Responsible for a Nosocomial Outbreak of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea, *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (2000) 2706–2714.
- [179] M.R. Popoff, E.J. Rubin, D.M. Gill, P. Boquet, Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain., *Infection and Immunity*. 56 (1988) 2299–2306.
- [180] F. Barbut, Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains, *Journal of Medical Microbiology*. 54 (2005) 181–185. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45804-0>.
- [181] C. Eckert, A. Emirian, A. Le Monnier, L. Cathala, H. De Montclos, J. Goret, P. Berger, A. Petit, A. De Chevigny, H. Jean-Pierre, B. Nebbad, S. Camiade, R. Meckenstock, V. Lalande, H. Marchandin, F. Barbut, Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B, *New Microbes and New Infections*. 3 (2015) 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.10.003>.
- [182] S. Bacci, K. Mølbak, M.K. Kjeldsen, K.E.P. Olsen, Binary Toxin and Death after *Clostridium difficile* Infection, *Emerg Infect Dis.* 17 (2011) 976–982. <https://doi.org/10.3201/eid1706.101483>.
- [183] J.M. Libby, T.D. Wilkins, Production of Antitoxins to Two Toxins of *Clostridium difficile* and Immunological Comparison of the Toxins by Cross-Neutralization Studies, *Infect Immun.* 35 (1982) 374–376.
- [184] R. Viscidi, B.E. Laughon, R. Yolken, P. Bo-Linn, T. Moench, R.W. Ryder, J.G. Bartlett, Serum Antibody Response to Toxins A and B of *Clostridium difficile*, *J Infect Dis.* 148 (1983) 93–100. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.1.93>.
- [185] L. Kyne, M. Warny, A. Qamar, C.P. Kelly, Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A, *New England Journal of Medicine*. 342 (2000) 390–397. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002103420604>.
- [186] G. de Bruyn, J. Saleh, D. Workman, R. Pollak, V. Elinoff, N.J. Fraser, G. Lefebvre, M. Martens, R.E. Mills, R. Nathan, M. Trevino, M. van Cleeff, G. Foglia, A. Ozol-Godfrey, D.M. Patel, P.J. Petrobon, R. Gesser, H-030-012 Clinical Investigator Study Team, Defining the optimal formulation and schedule of a candidate toxoid vaccine against *Clostridium difficile* infection: A randomized Phase 2 clinical trial, *Vaccine*. 34 (2016) 2170–2178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.028>.
- [187] R.N. Greenberg, T.C. Marbury, G. Foglia, M. Warny, Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine, *Vaccine*. 30 (2012) 2245–2249. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.065>.
- [188] S. Péchiné, A. Collignon, Immune responses induced by *Clostridium difficile*, *Anaerobe*. 41 (2016) 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.014>.

- [189] J.A. Kirk, O. Banerji, R.P. Fagan, Characteristics of the *Clostridium difficile* cell envelope and its importance in therapeutics, *Microb Biotechnol.* 10 (2016) 76–90. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12372>.
- [190] M.E. Mulligan, S.D. Miller, L.V. McFarland, H.C. Fung, R.Y. Kwok, Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*, *Clin. Infect. Dis.* 16 Suppl 4 (1993) S239-244.
- [191] J. Peltier, P. Courtin, I. El Meouche, L. Lemée, M.-P. Chapot-Chartier, J.-L. Pons, *Clostridium difficile* has an original peptidoglycan structure with a high level of N-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 29053–29062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259150>.
- [192] J. Ganeshapillai, E. Vinogradov, J. Rousseau, J.S. Weese, M.A. Monteiro, *Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units, *Carbohydrate Research.* 343 (2008) 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.002>.
- [193] C.W. Reid, E. Vinogradov, J. Li, H.C. Jarrell, S.M. Logan, J.-R. Brisson, Structural characterization of surface glycans from *Clostridium difficile*, *Carbohydrate Research.* 354 (2012) 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.02.002>.
- [194] S.E. Willing, T. Candela, H.A. Shaw, Z. Seager, S. Mesnage, R.P. Fagan, N.F. Fairweather, *Clostridium difficile* surface proteins are anchored to the cell wall using CWB2 motifs that recognise the anionic polymer PSII, *Molecular Microbiology.* 96 (2015) 596–608. <https://doi.org/10.1111/mmi.12958>.
- [195] Y. Jiao, Z. Ma, D. Hodgins, B. Pequegnat, L. Bertolo, L. Arroyo, M.A. Monteiro, *Clostridium difficile* PSI polysaccharide: synthesis of pentasaccharide repeating block, conjugation to exotoxin B subunit, and detection of natural anti-PSI IgG antibodies in horse serum, *Carbohydrate Research.* 378 (2013) 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.03.018>.
- [196] M.A. Monteiro, The Design of a *Clostridium difficile* Carbohydrate-Based Vaccine, in: S. Thomas (Ed.), *Vaccine Design*, Springer New York, New York, NY, 2016: pp. 397–408. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_21.
- [197] C.E. Martin, F. Broecker, S. Eller, M.A. Oberli, C. Anish, C.L. Pereira, P.H. Seeberger, Glycan arrays containing synthetic *Clostridium difficile* lipoteichoic acid oligomers as tools toward a carbohydrate vaccine, *Chemical Communications.* 49 (2013) 7159. <https://doi.org/10.1039/c3cc43545h>.
- [198] M.A. Oberli, M.-L. Hecht, P. Bindschädler, A. Adibekian, T. Adam, P.H. Seeberger, A Possible Oligosaccharide-Conjugate Vaccine Candidate for *Clostridium difficile* Is Antigenic and Immunogenic, *Chemistry & Biology.* 18 (2011) 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.03.009>.
- [199] M.R. Romano, R. Leuzzi, E. Cappelletti, M. Tontini, A. Nilo, D. Proietti, F. Berti, P. Costantino, R. Adamo, M. Scarselli, Recombinant *Clostridium difficile* Toxin Fragments as Carrier Protein for PSII Surface Polysaccharide Preserve Their Neutralizing Activity, *Toxins.* 6 (2014) 1385–1396. <https://doi.org/10.3390/toxins6041385>.
- [200] R.P. Fagan, N.F. Fairweather, Biogenesis and functions of bacterial S-layers, *Nature Reviews Microbiology.* 12 (2014) 211–222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>.
- [201] M. Cerquetti, A. Molinari, A. Sebastianelli, M. Diociaiuti, R. Petruzzelli, C. Capo, P. Mastrantonio, Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates, *Microb. Pathog.* 28 (2000) 363–372. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0356>.
- [202] E. Calabi, S. Ward, B. Wren, T. Paxton, M. Panico, H. Morris, A. Dell, G. Dougan, N. Fairweather, Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 1187–1199.
- [203] R.P. Fagan, C. Janoir, A. Collignon, P. Mastrantonio, I.R. Poxton, N.F. Fairweather, A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*, *Journal of Medical Microbiology.* 60 (2011) 1225–1228. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028472-0>.
- [204] R.P. Fagan, N.F. Fairweather, *Clostridium difficile* has two parallel and essential Sec secretion systems, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 27483–27493.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263889>.
- [205] J.M. Kirby, H. Ahern, A.K. Roberts, V. Kumar, Z. Freeman, K.R. Acharya, C.C. Shone, Cwp84, a Surface-associated Cysteine Protease, Plays a Role in the Maturation of the Surface Layer of *Clostridium difficile*, *Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 34666–34673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051177>.
- [206] E. Calabi, F. Calabi, A.D. Phillips, N.F. Fairweather, Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5770–5778.
- [207] A. Wright, D. Drudy, L. Kyne, K. Brown, N.F. Fairweather, Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera, *Journal of Medical Microbiology*. 57 (2008) 750–756. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47532-0>.
- [208] D. Drudy, E. Calabi, L. Kyne, S. Sougioultzis, E. Kelly, N. Fairweather, C.P. Kelly, Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 41 (2004) 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.03.007>.
- [209] J.B. O'Brien, M.S. McCabe, V. Athié-Morales, G.S.A. McDonald, D.B. Ní Eidhin, D.P. Kelleher, Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins, *FEMS Microbiol. Lett.* 246 (2005) 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.005>.
- [210] J.-F. Bruxelles, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné, Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models, *Anaerobe*. 37 (2016) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.010>.
- [211] K.E. Dingle, X. Didelot, M.A. Ansari, D.W. Eyre, A. Vaughan, D. Griffiths, C.L.C. Ip, E.M. Batty, T. Golubchik, R. Bowden, K.A. Jolley, D.W. Hood, W.N. Fawley, A.S. Walker, T.E. Peto, M.H. Wilcox, D.W. Crook, Recombinational switching of the *Clostridium difficile* S-layer and a novel glycosylation gene cluster revealed by large-scale whole-genome sequencing, *J. Infect. Dis.* 207 (2013) 675–686. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis734>.
- [212] J.-F. Bruxelles, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné, *Clostridium difficile* flagellin FliC: Evaluation as adjuvant and use in a mucosal vaccine against *Clostridium difficile*, *PLOS ONE*. 12 (2017) e0187212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187212>.
- [213] J.A. Kirk, D. Gebhart, A.M. Buckley, S. Lok, D. Scholl, G.R. Douce, G.R. Govoni, R.P. Fagan, New class of precision antimicrobials redefines role of *Clostridium difficile* S-layer in virulence and viability, *Science Translational Medicine*. 9 (2017) eaah6813. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6813>.
- [214] A.-J. Waligora, C. Hennequin, P. Mullany, P. Bourlioux, A. Collignon, T. Karjalainen, Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with Adhesive Properties, *Infection and Immunity*. 69 (2001) 2144–2153. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001>.
- [215] C. Janoir, S. Pechine, C. Grosdidier, A. Collignon, Cwp84, a Surface-Associated Protein of *Clostridium difficile*, Is a Cysteine Protease with Degrading Activity on Extracellular Matrix Proteins, *Journal of Bacteriology*. 189 (2007) 7174–7180. <https://doi.org/10.1128/JB.00578-07>.
- [216] S. Péchiné, C. Denève, A. Le Monnier, S. Hoys, C. Janoir, A. Collignon, Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen: Immunization of hamsters against *Clostridium difficile*, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 63 (2011) 73–81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00832.x>.
- [217] S. Pechine, Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*, *Journal of Medical Microbiology*. 54 (2005) 193–196. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45800-0>.
- [218] S. Pechine, C. Janoir, A. Collignon, Variability of *Clostridium difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Disease, *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (2005) 5018–5025. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5018-5025.2005>.
- [219] C. Janoir, C. Denève, S. Bouttier, F. Barbut, S. Hoys, L. Caleechum, D. Chapetón-Montes, F.C. Pereira, A.O. Henriques, A. Collignon, M. Monot, B. Dupuy, Adaptive Strategies and

- Pathogenesis of *Clostridium difficile* from In Vivo Transcriptomics, *Infection and Immunity*. 81 (2013) 3757–3769. <https://doi.org/10.1128/IAI.00515-13>.
- [220] C. Hennequin, Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*, *Microbiology*. 149 (2003) 2779–2787. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26145-0>.
- [221] A. Kovacs-Simon, R. Leuzzi, M. Kasendra, N. Minton, R.W. Titball, S.L. Michell, Lipoprotein CD0873 Is a Novel Adhesin of *Clostridium difficile*, *J Infect Dis*. 210 (2014) 274–284. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu070>.
- [222] S. Péchiné, C. Hennequin, C. Boursier, S. Hoys, A. Collignon, Immunization Using GroEL Decreases *Clostridium difficile* Intestinal Colonization, *PLOS ONE*. 8 (2013) e81112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081112>.
- [223] E. Stevenson, N.P. Minton, S.A. Kuehne, The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity, *Trends in Microbiology*. 23 (2015) 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.004>.
- [224] S.T. Baban, S.A. Kuehne, A. Barketi-Klai, S.T. Cartman, M.L. Kelly, K.R. Hardie, I. Kansau, A. Collignon, N.P. Minton, The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain, *PLoS ONE*. 8 (2013) e73026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>.
- [225] J. Batah, C. Denève-Larrazet, P.-A. Jolivot, S. Kuehne, A. Collignon, J.-C. Marvaud, I. Kansau, *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF- κ B pathway in epithelial cells, *Anaerobe*. 38 (2016) 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.01.002>.
- [226] C. Ghose, I. Eugenis, X. Sun, A.N. Edwards, S.M. McBride, D.T. Pride, C.P. Kelly, D.D. Ho, Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC, *Emerging Microbes & Infections*. 5 (2016) e8. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.8>.
- [227] I. Jarchum, M. Liu, L. Lipuma, E.G. Pamer, Toll-Like Receptor 5 Stimulation Protects Mice from Acute *Clostridium difficile* Colitis, *Infection and Immunity*. 79 (2011) 1498–1503. <https://doi.org/10.1128/IAI.01196-10>.
- [228] G. Martirosian, H. Pituch, P. Obuch-Woszczatyński, G. Rouyan, F. Meisel-Mikołajczyk, Evaluation of different methods for detection of *Clostridium difficile* toxins in Poland., *Acta Microbiol Pol*. 48 (1999) 349–353.
- [229] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [230] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels, *Anal. Chem*. 68 (1996) 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.
- [231] A. Pantosti, M. Cerquetti, F. Viti, G. Ortisi, P. Mastrantonio, Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea, *J. Clin. Microbiol*. 27 (1989) 2594–2597.
- [232] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*. 25 (1997) 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- [233] B. Rost, G. Yachdav, J. Liu, The PredictProtein server, *Nucleic Acids Res*. 32 (2004) W321–W326. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh377>.
- [234] M.C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, P. Marcatili, BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes, *Nucleic Acids Res*. 45 (2017) W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>.
- [235] Y. EL-Manzalawy, D. Dobbs, V. Honavar, Predicting linear B-cell epitopes using string kernels, *J Mol Recognit*. 21 (2008) 243–255. <https://doi.org/10.1002/jmr.893>.
- [236] J.M. Carter, Epitope Mapping of a Protein Using the Geysen (PEPSCAN) Procedure, in: *Peptide Analysis Protocols*, Humana Press, New Jersey, 2014: pp. 207–224. <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-274-4:207> (accessed February 25, 2014).
- [237] A. Jarzab, D. Witkowska, E. Ziomek, A. Dąbrowska, Z. Szewczuk, A. Gamian, Shigella flexneri 3a Outer Membrane Protein C Epitope Is Recognized by Human Umbilical Cord

- Sera and Associated with Protective Activity, *PLoS ONE*. 8 (2013) e70539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070539>.
- [238] Y. Shen, J. Maupetit, P. Derreumaux, P. Tufféry, Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction, *Journal of Chemical Theory and Computation*. 10 (2014) 4745–4758. <https://doi.org/10.1021/ct500592m>.
- [239] S. Lear, S.L. Cobb, Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment, *J Comput Aided Mol Des*. 30 (2016) 271–277. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9902-7>.
- [240] R. Vita, J.A. Overton, J.A. Greenbaum, J. Ponomarenko, J.D. Clark, J.R. Cantrell, D.K. Wheeler, J.L. Gabbard, D. Hix, A. Sette, B. Peters, The immune epitope database (IEDB) 3.0, *Nucleic Acids Res*. 43 (2015) D405–D412. <https://doi.org/10.1093/nar/gku938>.
- [241] D. Wang, L. Yang, P. Zhang, J. LaBaer, H. Hermjakob, D. Li, X. Yu, AAgAtlas 1.0: a human autoantigen database, *Nucleic Acids Res*. 45 (2017) D769–D776. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw946>.
- [242] L. Chun, Y. Xiaoping, H. Guangrong, W. Hong, Preparation and characterization of antigenic properties of gramicidin A- keyhole limpet hemocyanin and gramicidin A-ovalbumin conjugates, *African Journal of Biotechnology*. 8 (2009). <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/68793> (accessed February 20, 2019).
- [243] JACC Report 55 - Linear Polydimethylsiloxanes second edition, Ecetoc. (2018). <http://www.ecetoc.org/publication/jacc-report-55-linear-polydimethylsiloxanes-second-edition/> (accessed February 1, 2018).
- [244] B.J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Courier Corporation, 2000.
- [245] B.R. Ware, W.H. Flygare, Light scattering in mixtures of BSA, BSA dimers, and fibrinogen under the influence of electric fields, *Journal of Colloid and Interface Science*. 39 (1972) 670–675. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(72\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(72)90075-6).
- [246] E.S. Pearson, The Test of Significance for the Correlation Coefficient, *Journal of the American Statistical Association*. 26 (1931) 128–134. <https://doi.org/10.1080/01621459.1931.10503208>.
- [247] S. Rahimian, J.W. Kleinovink, M.F. Fransen, L. Mezzanotte, H. Gold, P. Wisse, H. Overkleeft, M. Amidi, W. Jiskoot, C.W. Löwik, F. Ossendorp, W.E. Hennink, Near-infrared labeled, ovalbumin loaded polymeric nanoparticles based on a hydrophilic polyester as model vaccine: In vivo tracking and evaluation of antigen-specific CD8+ T cell immune response, *Biomaterials*. 37 (2015) 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.043>.
- [248] N. Wang, X.S. Wu, Preparation and Characterization of Agarose Hydrogel Nanoparticles for Protein and Peptide Drug Delivery, *Pharmaceutical Development and Technology*. 2 (1997) 135–142. <https://doi.org/10.3109/10837459709022618>.
- [249] H. Jeffery, S.S. Davis, D.T. O'Hagan, The Preparation and Characterization of Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles. II. The Entrapment of a Model Protein Using a (Water-in-Oil)-in-Water Emulsion Solvent Evaporation Technique, *Pharm Res*. 10 (1993) 362–368. <https://doi.org/10.1023/A:1018980020506>.
- [250] A. Tankrathok, S. Daduang, R. Patramanon, T. Araki, S. Thammasirirak, Purification Process for the Preparation and Characterizations of Hen Egg White Ovalbumin, Lysozyme, Ovotransferrin, and Ovomucoid, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 39 (2009) 380–399. <https://doi.org/10.1080/10826060903209646>.
- [251] D. Blanco, M.J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 45 (1998) 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00011-3).
- [252] M.I. Ugwoke, R.U. Agu, N. Verbeke, R. Kinget, Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (2005) 1640–1665. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.009>.
- [253] S.S. Hehar, J.D.T. Mason, A.B. Stephen, N. Washington, N.S. Jones, S.J. Jackson, D. Bush, Twenty-four hour ambulatory nasal pH monitoring, *Clinical Otolaryngology & Allied*

- Sciences. 24 (1999) 24–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1999.00190.x>.
- [254] S. Arora, M.A. Olszewski, T.M. Tsang, R.A. McDonald, G.B. Toews, G.B. Huffnagle, Effect of Cytokine Interplay on Macrophage Polarization during Chronic Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans*, *Infect. Immun.* 79 (2011) 1915–1926. <https://doi.org/10.1128/IAI.01270-10>.
- [255] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat Protoc.* 1 (2006) 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- [256] R. Higdon, E. Kolker, A predictive model for identifying proteins by a single peptide match, *Bioinformatics.* 23 (2007) 277–280. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl595>.
- [257] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins, *Trends in Biochemical Sciences.* 24 (1999) 8–11. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01335-8).
- [258] A. Razim, K. Pacyga, M. Aptekorz, G. Martirosian, A. Szuba, E. Pawlak-Adamska, M. Brzywczy-Włoch, A. Myc, A. Gamian, S. Górska, Epitopes identified in GAPDH from *Clostridium difficile* recognized as common antigens with potential autoimmunizing properties, *Scientific Reports.* 8 (2018) 13946. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32193-9>.
- [259] M. Biazzo, R. Cioncada, L. Fiaschi, V. Tedde, P. Spigaglia, P. Mastrantonio, M. Pizza, M.A. Barocchi, M. Scarselli, C.L. Galeotti, Diversity of *cwp* loci in clinical isolates of *Clostridium difficile*, *Journal of Medical Microbiology.* 62 (2013) 1444–1452. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058719-0>.
- [260] S. Biarrotte-Sorin, J.-E. Hugonnet, V. Delfosse, J.-L. Mainardi, L. Gutmann, M. Arthur, C. Mayer, Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase, *Journal of Molecular Biology.* 359 (2006) 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.014>.
- [261] A. Marchler-Bauer, Y. Bo, L. Han, J. He, C.J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L.Y. Geer, S.H. Bryant, CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D200–D203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>.
- [262] R. Rivas, C. Gutiérrez, A. Abril, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, A. Ventosa, E. Velázquez, *Paenibacillus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Cicer arietinum*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 55 (2005) 1305–1309. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63513-0>.
- [263] R. Rozpończyk, J. Szemraj, M. Malinowski, J. Rozpończyk, Stafylokinaza – selektywny aktywator plazminogenu, *Postępy Biochemii.* 52 (2006) 80–86.
- [264] P.A.M. Warmerdam, S. Plaisance, K. Vanderlick, P. Vandervoort, K. Brepoels, D. Collen, M.D. Maeyer, Elimination of a Human T-cell Region in Staphylokinase by T-cell Screening and Computer Modeling, *Thromb Haemost.* 87 (2002) 666–673. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613064>.
- [265] M.L. Nguyen, S. Terzyan, J.D. Ballard, J.A. James, A.D. Farris, The Major Neutralizing Antibody Responses to Recombinant Anthrax Lethal and Edema Factors Are Directed to Non-Cross-Reactive Epitopes, *Infection and Immunity.* 77 (2009) 4714–4723. <https://doi.org/10.1128/IAI.00749-09>.
- [266] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release.* 235 (2016) 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- [267] C. Tropea, A.L. Yarin, *Springer Handbook of Experimental Fluid Mechanics*, Springer Science & Business Media, 2007.
- [268] K.B. Adler, Y. Li, Airway Epithelium and Mucus, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25 (2001) 397–400. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.4.f214>.
- [269] J.K. Sheehan, M. Kesimer, R. Pickles, Innate immunity and mucus structure and function, *Novartis Found. Symp.* 279 (2006) 155–166; discussion 167–169, 216–219.
- [270] S. Gallucci, M. Lolkema, P. Matzinger, Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells, *Nature Medicine.* 5 (1999) 1249–1255. <https://doi.org/10.1038/15200>.
- [271] Y. Shi, W. Zheng, K.L. Rock, Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses, *PNAS.* 97 (2000) 14590–14595.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.260497597>.
- [272] A.-L. Stenfeldt, C. Wennerås, Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils, *Immunology*. 112 (2004) 605–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01906.x>.
- [273] V.E.J.C. Schijns, Induction and Direction of Immune Responses by Vaccine Adjuvants, *Critical ReviewsTM in Immunology*. 21 (2001) 11. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v21.i1-3.50>.
- [274] S. Gallucci, P. Matzinger, Danger signals: SOS to the immune system, *Current Opinion in Immunology*. 13 (2001) 114–119. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00191-6).
- [275] V. Seow, J. Lim, A. Iyer, J.Y. Suen, J.K. Ariffin, D.M. Hohenhaus, M.J. Sweet, D.P. Fairlie, Inflammatory Responses Induced by Lipopolysaccharide Are Amplified in Primary Human Monocytes but Suppressed in Macrophages by Complement Protein C5a, *The Journal of Immunology*. 191 (2013) 4308–4316. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301355>.
- [276] X. Chen, K. Katchar, J.D. Goldsmith, N. Nanthakumar, A. Cheknis, D.N. Gerding, C.P. Kelly, A Mouse Model of *Clostridium difficile*–Associated Disease, *Gastroenterology*. 135 (2008) 1984–1992. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>.
- [277] T. Burkholder, C. Foltz, E. Karlsson, C.G. Linton, J.M. Smith, Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice, *Curr Protoc Mouse Biol*. 2 (2012) 145–165. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>.
- [278] E. Tolosano, S. Fagoonee, E. Hirsch, F.G. Berger, H. Baumann, L. Silengo, F. Altruda, Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis, *Blood*. 100 (2002) 4201–4208. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1270>.
- [279] M. Patel, R.I. Glass, B. Jiang, M. Santosham, B. Lopman, U. Parashar, A Systematic Review of Anti-Rotavirus Serum IgA Antibody Titer as a Potential Correlate of Rotavirus Vaccine Efficacy, *J Infect Dis*. 208 (2013) 284–294. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit166>.
- [280] M.M. McNeal, R.L. Broome, R.L. Ward, Active Immunity against Rotavirus Infection in Mice Is Correlated with Viral Replication and Titers of Serum Rotavirus IgA Following Vaccination, *Virology*. 204 (1994) 642–650. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1579>.
- [281] S.K. Davis, K.J. Selva, S.J. Kent, A.W. Chung, Serum IgA Fc effector functions in infectious disease and cancer, *Immunology & Cell Biology*. n/a (n.d.). <https://doi.org/10.1111/imcb.12306>.
- [282] K.W. Leong, J.L. Ding, The Unexplored Roles of Human Serum IgA, *DNA Cell Biol*. 33 (2014) 823–829. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2639>.
- [283] Surveillance Atlas of Infectious Diseases, (n.d.). <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=78&Indicator=390991&GeoResolution=1&TimeResolution=Year&StartTime=2016&EndTime=2017&CurrentTime=2017&Distribution=R&DistributionRepresentation=B&TimeSeries=region&TimeSeriesRepresentation=T> (accessed December 4, 2019).
- [284] W. Hryniewicz Martirosian, Gayane. , Ozorowski, Tomasz, Narodowy Instytut Leków, Zakażenia *Clostridium difficile*: diagnostyka, terapia, profilaktyka, Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2011.
- [285] W. Hryniewicz, M. Kravanja, T. Ozorowski, Narodowy Instytut Leków, Sprawozdanie z realizacji Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków: Moduł 1: lecznictwo zamknięte/szpitalne pilotażowe, analiza danych ze szpitali pilotażowych: zużycie antybiotyków, monitorowanie zakażeń krwi, monitorowanie punktowe zakażeń i stosowania antybiotyków, Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2012.
- [286] N.E. Simister, Placental transport of immunoglobulin G, *Vaccine*. 21 (2003) 3365–3369.
- [287] F.C. Lin, L.E. Weisman, P.H. Azimi, J.B. Philips III, P. Clark, J. Regan, G.G. Rhoads, C.E. Frasch, B.M. Gray, J. Troendle, R.A. Brenner, P. Moyer, J.D. Clemens, Level of Maternal IgG Anti-Group B Streptococcus Type III Antibody Correlated with Protection of Neonates against Early-Onset Disease Caused by This Pathogen, *The Journal of Infectious Diseases*. 190 (2004) 928–934. <https://doi.org/10.1086/422756>.
- [288] R. Eglow, C. Pothoulakis, S. Itzkowitz, E.J. Israel, C.J. O’Keane, D. Gong, N. Gao, Y.L. Xu, W.A. Walker, J.T. LaMont, Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in

- newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor., *J Clin Invest.* 90 (1992) 822–829. <https://doi.org/10.1172/JCI115957>.
- [289] E. Valiente, M.D. Cairns, B.W. Wren, The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage: a pathogen on the move, *Clinical Microbiology and Infection.* 20 (2014) 396–404. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12619>.
- [290] R. Brouwer, I.G.M. de Groot, F.B.M. Verheij, Comparison of maternal and cord serum titres for measles and for rubella antibodies, *Archiv f Virusforschung.* 44 (1974) 237–242. <https://doi.org/10.1007/BF01240611>.
- [291] N. Sengupta, S.I. Alam, B. Kumar, R.B. Kumar, V. Gautam, S. Kumar, L. Singh, Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Proteins of *Clostridium perfringens* Type A and Type C Strains, *Infection and Immunity.* 78 (2010) 3957–3968. <https://doi.org/10.1128/IAI.00374-10>.
- [292] M. Lavollay, M. Arthur, M. Fourgeaud, L. Dubost, A. Marie, N. Veziris, D. Blanot, L. Gutmann, J.-L. Mainardi, The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by l,d-Transpeptidation, *Journal of Bacteriology.* 190 (2008) 4360–4366. <https://doi.org/10.1128/JB.00239-08>.
- [293] L. Sütterlin, Z. Edoó, J.-E. Hugonnet, J.-L. Mainardi, M. Arthur, Peptidoglycan Cross-Linking Activity of l,d-Transpeptidases from *Clostridium difficile* and Inactivation of These Enzymes by β -Lactams, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 62 (2018) e01607-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01607-17>.
- [294] S. Triboulet, V. Dubée, L. Lecoq, C. Bougault, J.-L. Mainardi, L.B. Rice, M. Ethève-Quelquejeu, L. Gutmann, A. Marie, L. Dubost, J.-E. Hugonnet, J.-P. Simorre, M. Arthur, Kinetic Features of L,D-Transpeptidase Inactivation Critical for β -Lactam Antibacterial Activity, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067831>.
- [295] D. Zhu, J. Bullock, Y. He, X. Sun, Cwp22, a novel peptidoglycan cross-linking enzyme, plays pleiotropic roles in *Clostridioides difficile*, *Environ. Microbiol.* (2019). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14706>.
- [296] H. Xin, S. Dziadek, D.R. Bundle, J.E. Cutler, Synthetic glycopeptide vaccines combining -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105 (2008) 13526–13531. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803195105>.
- [297] D. Bessen, V.A. Fischetti, Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci, *Infect. Immun.* 56 (1988) 2666–2672.
- [298] W.-Y. Zhou, Y. Shi, C. Wu, W.-J. Zhang, X.-H. Mao, G. Guo, H.-X. Li, Q.-M. Zou, Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model, *Vaccine.* 27 (2009) 5013–5019. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.009>.
- [299] Y. Gu, J. Wei, J. Yang, J. Huang, X. Yang, X. Zhu, Protective Immunity against *Trichinella spiralis* Infection Induced by a Multi-Epitope Vaccine in a Murine Model, *PLOS ONE.* 8 (2013) e77238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077238>.
- [300] J.L. Pellequer, E. Westhof, M.H.V. Van Regenmortel, [8] Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures, in: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1991: pp. 176–201. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)03010-E](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)03010-E).
- [301] J. Bielnicki, Y. Devedjiev, U. Derewenda, Z. Dauter, A. Joachimiak, Z.S. Derewenda, B. subtilis ykuD protein at 2.0 Å resolution: Insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 62 (2006) 144–151. <https://doi.org/10.1002/prot.20702>.
- [302] M. Mutter, K.-H. Altmann, K. Müller, S. Vuilleumier, T. Vorherr, Approaches to Synthetic Vaccines Design of Epitope-Containing Amphiphilic Peptides Matching the Antigenic Structure in the Native Protein, *Helvetica Chimica Acta.* 69 (1986) 985–995. <https://doi.org/10.1002/hlca.19860690505>.
- [303] R. Jemmerson, R.M. Hutchinson, Fine manipulation of antibody affinity for synthetic epitopes by altering peptide structure: Antibody binding to looped peptides, *European Journal of Immunology.* 20 (1990) 579–585. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200318>.

- [304] P.H. Andersen, M. Nielsen, O. Lund, Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures, *Protein Science*. 15 (2006) 2558–2567. <https://doi.org/10.1110/ps.062405906>.
- [305] M.Z. Atassi, R.C. Pai, Immunochemistry of sperm-whale myoglobin—XXII: Accurate delineation of the single reactive region in sequence 103–120 by immunochemical studies of synthetic peptides: The complete antigenic structure of the protein, *Immunochemistry*. 12 (1975) 735–740. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(75\)90223-2](https://doi.org/10.1016/0019-2791(75)90223-2).
- [306] M. Pyclik, S. Górska, E. Brzozowska, A. Dobrut, J. Ciekot, A. Gamian, M. Brzychczy-Włoch, Epitope Mapping of *Streptococcus agalactiae* Elongation Factor Tu Protein Recognized by Human Sera, *Front. Microbiol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00125>.
- [307] D.C. Hancock, N.J. O'Reilly, Synthetic Peptides as Antigens for Antibody Production, in: R. Burns (Ed.), *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005: pp. 13–25. <https://doi.org/10.1385/1-59259-873-0:013>.
- [308] F. Hudecz, Manipulation of Epitope Function by Modification of Peptide Structure: A Minireview, *Biologicals*. 29 (2001) 197–207. <https://doi.org/10.1006/biol.2001.0305>.
- [309] S. Albitar, B. Bourgeon, R. Genin, M. Fen-Chong, P. N'Guyen, M.O. Serveaux, H. Atchia, D. Schohn, Bilateral retrobulbar optic neuritis with hepatitis B vaccination., *Nephrol Dial Transplant*. 12 (1997) 2169–2170. <https://doi.org/10.1093/ndt/12.10.2169>.
- [310] O. Stewart, B. Chang, J. Bradbury, Simultaneous administration of hepatitis B and polio vaccines associated with bilateral optic neuritis, *British Journal of Ophthalmology*. 83 (1999) 1194–1194. <https://doi.org/10.1136/bjo.83.10.1194g>.
- [311] K. Gross, C. Combe, K. Krüger, M. Schattenkirchner, Arthritis after Hepatitis B Vaccination: Report of three Cases, *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 24 (1995) 50–52. <https://doi.org/10.3109/03009749509095156>.
- [312] W.B. Williams, H.-X. Liao, M.A. Moody, T.B. Kepler, S.M. Alam, F. Gao, K. Wiehe, A.M. Trama, K. Jones, R. Zhang, H. Song, D.J. Marshall, J.F. Whitesides, K. Sawatzki, A. Hua, P. Liu, M.Z. Tay, K.E. Seaton, X. Shen, A. Foulger, K.E. Lloyd, R. Parks, J. Pollara, G. Ferrari, J.-S. Yu, N. Vandergrift, D.C. Montefiori, M.E. Sobieszczyk, S. Hammer, S. Karuna, P. Gilbert, D. Grove, N. Grunenber, M.J. McElrath, J.R. Mascola, R.A. Koup, L. Corey, G.J. Nabel, C. Morgan, G. Churchyard, J. Maenza, M. Keefer, B.S. Graham, L.R. Baden, G.D. Tomaras, B.F. Haynes, Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies, *Science*. 349 (2015) aab1253. <https://doi.org/10.1126/science.aab1253>.
- [313] A.A. Chepurnov, L.F. Bakulina, A.A. Dadaeva, E.N. Ustinova, T.S. Chepurnova, J.R. Baker, Inactivation of Ebola virus with a surfactant nanoemulsion, *Acta Tropica*. 87 (2003) 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00120-7).
- [314] A.U. Bielinska, A.A. Chepurnov, J.J. Landers, K.W. Janczak, T.S. Chepurnova, G.D. Luker, J.R. Baker, A Novel, Killed-Virus Nasal Vaccinia Virus Vaccine, *Clinical and Vaccine Immunology*. 15 (2008) 348–358. <https://doi.org/10.1128/CVI.00440-07>.
- [315] A.U. Bielinska, K.W. Janczak, J.J. Landers, P. Makidon, L.E. Sower, J.W. Peterson, J.R. Baker, Mucosal Immunization with a Novel Nanoemulsion-Based Recombinant Anthrax Protective Antigen Vaccine Protects against *Bacillus anthracis* Spore Challenge, *Infection and Immunity*. 75 (2007) 4020–4029. <https://doi.org/10.1128/IAI.00070-07>.
- [316] L.R. Stanberry, J.K. Simon, C. Johnson, P.L. Robinson, J. Morry, M.R. Flack, S. Gracon, A. Myc, T. Hamouda, J.R. Baker, Safety and immunogenicity of a novel nanoemulsion mucosal adjuvant W805EC combined with approved seasonal influenza antigens, *Vaccine*. 30 (2012) 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.094>.
- [317] J.M. Robinson, Chapter 5 - Vaccine Production: Main Steps and Considerations, in: B.R. Bloom, P.-H. Lambert (Eds.), *The Vaccine Book (Second Edition)*, Academic Press, 2016: pp. 77–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802174-3.00005-9>.
- [318] S.C. Das, M. Hatta, P.R. Wilker, A. Myc, T. Hamouda, G. Neumann, J.R. Baker, Y. Kawaoka, Nanoemulsion W805EC improves immune responses upon intranasal delivery of an inactivated pandemic H1N1 influenza vaccine, *Vaccine*. 30 (2012) 6871–6877. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.007>.

- [319] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Biomaterials*. 31 (2010) 3657–3666. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>.
- [320] S.C. Yang, S. Benita, Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions, *Drug Development Research*. 50 (2000) 476–486. [https://doi.org/10.1002/1098-2299\(200007/08\)50:3/4<476::AID-DDR31>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4<476::AID-DDR31>3.0.CO;2-6).
- [321] D. Chen, D. Kristensen, Opportunities and challenges of developing thermostable vaccines, *Expert Review of Vaccines*. 8 (2009) 547–557. <https://doi.org/10.1586/erv.09.20>.
- [322] L. Wu, J. Zhang, W. Watanabe, Physical and chemical stability of drug nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63 (2011) 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>.
- [323] J. Zhang, C.-Z. Ye, Z.-Y. Liu, Q. Yang, Y. Ye, Preparation And Antibacterial Effects Of Carboxymethyl Chitosan-Modified Photo-Responsive Camellia Sapogenin Derivative Cationic Liposomes, *International Journal of Nanomedicine*. (2019). <https://doi.org/10.2147/IJN.S218101>.
- [324] V.V. Khutoryanskiy, Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers, *Macromolecular Bioscience*. 11 (2011) 748–764. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000388>.
- [325] S.-H.S. Leung, J.R. Robinson, Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II, *Journal of Controlled Release*. 12 (1990) 187–194. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(90\)90099-F](https://doi.org/10.1016/0168-3659(90)90099-F).
- [326] I. Pereira de Sousa, C. Steiner, M. Schmutzler, M.D. Wilcox, G.J. Veldhuis, J.P. Pearson, C.W. Huck, W. Salvenmoser, A. Bernkop-Schnürch, Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 97 (2015) 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.024>.
- [327] H. Takeuchi, J. Thongborisute, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (2005) 1583–1594. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.008>.
- [328] S. Zhang, S. Huang, L. Lu, X. Song, P. Li, F. Wang, Curdlan sulfate–O-linked quaternized chitosan nanoparticles: potential adjuvants to improve the immunogenicity of exogenous antigens via intranasal vaccination, *International Journal of Nanomedicine*. (2018). <https://doi.org/10.2147/IJN.S158536>.
- [329] G.V. Guibas, M. Makris, E. Spandou, K.N. Priftis, Exposure of immunologically naive laboratory rodents to antigen via the airways. Where does tolerance stop and sensitization begin?, *Clinical & Experimental Allergy*. 42 (2012) 1552–1565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03974.x>.
- [330] N. Washington, R.J. Steele, S.J. Jackson, D. Bush, J. Mason, D.A. Gill, K. Pitt, D.A. Rawlins, Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers, *Int J Pharm*. 198 (2000) 139–146.
- [331] M.L. Mbow, E. De Gregorio, N.M. Valiante, R. Rappuoli, New adjuvants for human vaccines, *Current Opinion in Immunology*. 22 (2010) 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.004>.
- [332] K.-I. Jang, H.G. Lee, Stability of Chitosan Nanoparticles for l-Ascorbic Acid during Heat Treatment in Aqueous Solution, *J. Agric. Food Chem*. 56 (2008) 1936–1941. <https://doi.org/10.1021/jf073385e>.
- [333] I. Nallamuthu, A. Devi, F. Khanum, Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 10 (2015) 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.005>.
- [334] B. Sauter, M.L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, N. Bhardwaj, Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells, *Journal of Experimental Medicine*. 191 (2000) 423–434. <https://doi.org/10.1084/jem.191.3.423>.
- [335] J.R. Klune, R. Dhupar, J. Cardinal, T.R. Billiar, A. Tsung, HMGB1: Endogenous Danger

- Signaling, *Mol Med.* 14 (2008) 476–484. <https://doi.org/10.2119/2008-00034.Klune>.
- [336] E.R. Lazarowski, L. Homolya, R.C. Boucher, T.K. Harden, Direct Demonstration of Mechanically Induced Release of Cellular UTP and Its Implication for Uridine Nucleotide Receptor Activation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24348–24354. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24348>.
- [337] M. Schnurr, F. Then, P. Galambos, C. Scholz, B. Siegmund, S. Endres, A. Eigler, Extracellular ATP and TNF- α Synergize in the Activation and Maturation of Human Dendritic Cells, *The Journal of Immunology.* 165 (2000) 4704–4709. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4704>.
- [338] M.E. Bianchi, DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger, *Journal of Leukocyte Biology.* 81 (2007) 1–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>.
- [339] B.U. Orzechowska, J.F. Kukowska-Latallo, A.D. Coulter, Z. Szabo, A. Gamian, A. Myc, Nanoemulsion-based mucosal adjuvant induces apoptosis in human epithelial cells, *Vaccine.* 33 (2015) 2289–2296. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.002>.
- [340] A.U. Bielinska, P.E. Makidon, K.W. Janczak, L.P. Blanco, B. Swanson, D.M. Smith, T. Pham, Z. Szabo, J.F. Kukowska-Latallo, J.R. Baker, Distinct Pathways of Humoral and Cellular Immunity Induced with the Mucosal Administration of a Nanoemulsion Adjuvant, *The Journal of Immunology.* 192 (2014) 2722–2733. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301424>.
- [341] K.R. Jadhav, M.N. Gambhire, I.M. Shaikh, V.J. Kadam, S.S. Pisal, Nasal Drug Delivery System-Factors Affecting and Applications, (2007). <https://doi.org/info:doi/10.2174/157488507779422374>.
- [342] M.R. Neutra, E. Pringault, J.-P. Kraehenbuhl, Antigen Sampling Across Epithelial Barriers and Induction of Mucosal Immune Responses, *Annual Review of Immunology.* 14 (1996) 275–300. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.275>.
- [343] N. Oh, J.-H. Park, Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *Int J Nanomedicine.* 9 (2014) 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>.
- [344] Q. Mu, G. Jiang, L. Chen, H. Zhou, D. Fourches, A. Tropsha, B. Yan, Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems, *Chem. Rev.* 114 (2014) 7740–7781. <https://doi.org/10.1021/cr400295a>.
- [345] R. Wattiaux, M. Jadot, M.-T. Warnier-Pirotte, S.W.-D. Coninck, Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro, *FEBS Letters.* 417 (1997) 199–202. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01283-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01283-0).
- [346] X. Wang, F.F. Becker, P.R.C. Gascoyne, Membrane dielectric changes indicate induced apoptosis in HL-60 cells more sensitively than surface phosphatidylserine expression or DNA fragmentation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1564 (2002) 412–420. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00495-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00495-9).
- [347] P. Patel, G.H. Markx, Dielectric measurement of cell death, *Enzyme and Microbial Technology.* 43 (2008) 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.09.005>.
- [348] H.J. Kim, J.-K. Kim, S.B. Seo, H.J. Lee, H.-J. Kim, Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as Adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus, *Arch Pharm Res.* 30 (2007) 366–371. <https://doi.org/10.1007/BF02977620>.
- [349] C. Wan, Y. Zhou, Y. Yu, L. Juan Peng, W. Zhao, X. Zheng, B-cell epitope KT-12 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: a novel peptide vaccine candidate, *Microbiology and Immunology.* 55 (2011) 247–253. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00316.x>.
- [350] Y. Hagiwara, K. Komase, Z. Chen, K. Matsuo, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, S. Tamura, Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine, *Vaccine.* 17 (1999) 2918–2926. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00135-8).
- [351] T. Stratmann, Cholera Toxin Subunit B as Adjuvant—An Accelerator in Protective Immunity and a Break in Autoimmunity, *Vaccines (Basel).* 3 (2015) 579–596. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030579>.
- [352] E.D. Gregorio, E. Tritto, R. Rappuoli, Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery, *European Journal of Immunology.* 38 (2008) 2068–2071.

<https://doi.org/10.1002/eji.200838648>.

- [353] R.P. Choudhury, S.J. Cleator, An examination of needlestick injury rates, hepatitis B vaccination uptake and instruction on 'sharps' technique among medical students, *Journal of Hospital Infection*. 22 (1992) 143–148. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(92\)90098-7](https://doi.org/10.1016/0195-6701(92)90098-7).
- [354] P. Duclos, A global perspective on vaccine safety, *Vaccine*. 22 (2004) 2059–2063. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.010>.

11. Spis rycin

Rysunek 1 Mechanizmy obronne śluzówki.....	12
Rysunek 2 Sygnały aktywacji limfocytów T.....	22
Rysunek 3 Organizacja powierzchni CD	38
Rysunek 4 Polimery budujące ścianę komórkową CD	40
Rysunek 5 Schemat szczepienia myszy	73
Rysunek 6 Analiza immunoreaktywności białek CD.....	76
Rysunek 7 Analiza domen i struktury II-rzędowej białka Cwp22	82
Rysunek 8 Strategia wyboru 16-aminokwasowych sekwencji użytych do mapowania epitopów białka Cwp22.....	84
Rysunek 9 Mapowanie białka Cwp22.....	86
Rysunek 10 Wynik mapowania regionu sekwencji 2, 3, 4 białka Cwp22	88
Rysunek 11 Poszukiwanie epitopu.....	90
Rysunek 12 Oddziaływania NAC z mucyną.....	98
Rysunek 13 Wpływ dodatku białka modelowego OVA na parametry NAC	100
Rysunek 14 Wiązanie owalbuminy przez NAC	101
Rysunek 15 Wpływ NAC na integralność białka modelowego	102
Rysunek 16 Wpływ sterylizacji na właściwości NAC	103
Rysunek 17 Wpływ fizjologicznych zakresów stężeń soli na właściwości fizykochemiczne NAC	104
Rysunek 18 Wpływ fizjologicznych zakresów pH na właściwości fizykochemiczne NAC.....	104
Rysunek 19 Cytotoksyczność NAC względem komórek wybranych linii nabłonkowych i odpornościowych	107
Rysunek 20 Wpływ NAC na indukcję TNF- α	109
Rysunek 21 Wpływ 0,03% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki dendrytyczne	110
Rysunek 22 Wpływ 0,03% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki nabłonkowe	111
Rysunek 23 Wpływ 0,06% NAC na pochłanianie DQ-OVA przez komórki nabłonkowe	112
Rysunek 24 Wpływ 0,01% NAC na przekazywanie białka pomiędzy komórkami nabłonkowymi, a dendrytycznymi	114
Rysunek 25 Analiza spektrofotometryczna koniugatów	119
Rysunek 26 Schemat eksperymentu in vivo.....	121
Rysunek 27 Stosunek masy śledziony do masy ciała obliczony dla szczepionych myszy	123
Rysunek 28 Poziom wszystkich przeciwciał IgG w surowicy szczepionych myszy	124
Rysunek 29 Poziom całkowitych IgA w surowicy szczepionych myszy.....	126
Rysunek 30 Porównanie średnich poziomów przeciwciał IgA w surowicy krwi myszy szczepionych protoszczepionkami zawierającymi NAC i koniugaty dla dwóch dróg podania	127
Rysunek 31 Poziomy specyficznych przeciwciał IgG względem sekwencji peptydowych będącymi składnikami koniugatów zastosowanych w protoszczepionkach podanych donosowo	128
Rysunek 32 Poziomy specyficznych przeciwciał IgG względem sekwencji peptydowych będącymi składnikami koniugatów zastosowanych w protoszczepionkach podanych domięśniowo	130
Rysunek 33 Poziomy specyficznych przeciwciał IgA względem sekwencji peptydowych będącymi składnikami koniugatów zastosowanych w protoszczepionkach podanych donosowo.	132
Rysunek 34 Porównanie odpowiedzi na szczepienie w postaci specyficznych przeciwciał IgA względem peptydów i białka nośnikowego w zależności od drogi podania protoszczepionki.	133

12. Spis tabel

Tabela 1 Porównanie dróg podania szczepionki.	17
Tabela 2 Charakterystyka adiuwantów śluzówkowych.	24
Tabela 3 Dane dotyczące użytych szczepów klinicznych.	48
Tabela 4 Opis surowic pacjentów z CDI użytych w badaniach.	50
Tabela 5 Opis surowic krwi pępowinowej.	51
Tabela 6 Lista zastosowanych detergentów.	61
Tabela 7 Skład uzyskanych stabilnych nanoadiuwantów	64
Tabela 8 Opis grup myszy użytych w eksperymencie badającym toksyczność NAC in vivo	71
Tabela 9 Opis badanych grup w doświadczeniu określającym wpływ protoszczepionki na indukcję przeciwciał.	72
Tabela 10 Wynik identyfikacji immunoreaktywnych białek CD.	78
Tabela 11 Wynik analizy zmienności sekwencji białka Cwp22 pomiędzy szczepami CD, uzyskany w oparciu o dane z serwera BLAST oraz NCBI	80
Tabela 12 Wynik analizy białek homologicznych dla białka Cwp22w oparciu o dane uzyskane z serwera BLAST i NCBI.	81
Tabela 13 Wynik przewidywania epitopów dla limfocytów B i T	83
Tabela 14 Charakterystyka uzyskanych epitopów.	91
Tabela 15 Wpływ długotrwałego przechowywania na wielkość kropel NAC.	95
Tabela 16 Wpływ długotrwałego przechowywania na potencjał zeta NAC.	96
Tabela 17 Wynik pomiaru mas myszy, którym podano NAC	115
Tabela 18 Właściwości fizykochemiczne i biologiczne NAC3, 7 i 13	117
Tabela 19 Badanie masy ciała szczepionych myszy	122

13. Dorobek naukowy

Publikacje:

1. Pacyga, K., **Razim, A.**, Martirosian, G., Aptekorz, M., Szuba, A., Gamian, A., Myc, A., Górńska, S. (2020). Designing an epitope-based vaccine against *Clostridioides difficile* applying bioinformatic analysis and *in vitro* studies of M24 aminopeptidase. Praca przesłana do recenzji, *Cells* **IF 5,656**
2. **Razim, A.**, Pacyga, K., Martirosian, G., Szuba, A., Gamian, A., Myc, A., Górńska, S. (2019). Mapping Epitopes of a Novel Peptidoglycan Cross-Linking Enzyme Cwp22 Recognized by Human Sera Obtained from Patients with *Clostridioides difficile* Infection and Cord Blood. *Microorganisms*, 7 (11). **IF 4,167**
3. **Razim, A.**, Pacyga, K., Aptekorz, M., Martirosian, G., Szuba, A., Pawlak-Adamska, E., Brzywczy-Włoch, M., Myc, A., Gamian, A., Górńska, S. (2018). Epitopes identified in GAPDH from *Clostridium difficile* recognized as common antigens with potential autoimmunizing properties. *Scientific reports*, 8 (1), 13946. **IF 4,525**
4. Ziaco, M., Górńska, S., Traboni, S., **Razim, A.**, Casillo, A., Iadonisi, A., Gamian A., Corsaro M.M., Bedini, E. (2017). Development of Clickable Monophosphoryl Lipid A Derivatives toward Semisynthetic Conjugates with Tumor-Associated Carbohydrate Antigens. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (23), 9757-9768. **IF 6,259**
5. Górńska, S., Dylus, E., Rudawska, A., Brzozowska, E., Srutkova, D., Schwarzer, M., **Razim, A.**, Kozakova, H., Gamian, A. (2016). Immunoreactive proteins of *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 and *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 Identified by gnotobiotic mono-colonized mice sera, immune rabbit sera and non-immune human sera. *Frontiers in microbiology*, 7, 1537. **IF 4,076**
6. **Mehlich, A.**, Górńska, S., Myc, A., Gamian, A. (2015). Wybrane aspekty zakażeń *Clostridium difficile*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 69, 598-611. **IF 1,106**

Komunikaty zjazdowe:

1. Translational Immunology 26-27.03.2020 Ghent, Belgia. Przyjęty abstract: *Bifidobacterium* species in the therapy of allergy. **Razim A.**, *Pyclik M., Pacyga K., Leszczyńska K., Jakubczyk D., Górską S.* Stypendium wyjazdowe.
2. 13th Vaccine Congress, 15-18.09.2019 Bangkok, Tajlandia:

Wystąpienie ustne: Epitope mapping of *Clostridioides difficile* flagellar proteins. **Razim A.**, *Pacyga K., Szuba A., Myc A., Gamian A., Górską S.*

Plakat: Cross-reactivity and potential autoimmunoreactive properties of GAPDH from *Clostridioides difficile*. **Razim A.**, *Pacyga K., Szuba A., Myc A., Gamian A., Górską S.*
3. 4th International Conference Man-Food-Health, 29.03.2019 Wrocław, Polska.

Wystąpienie ustne: How a healthy nutrition makes your immune system vigorous. *Myc A., **Razim A.***
4. October SciFest, 4.10.2018 Novy Hradek, Czechy. Wystąpienie ustne: Emulsion-based nanoadjuvants as novel mucosal adjuvants. **Razim A.**
5. 12th Vaccine Congress, 16-19.09.2018 Budapeszt, Węgry. Plakat: Long-term stable silicon oil-based emulsions as novel class of adjuvants. **Razim A.**, *Górską S., Olszewski M., Gamian A., Myc A.*
6. International Conference on Vaccines & Vaccination, 23-25.07.2018 Osaka, Japonia. Wystąpienie ustne online: Evaluation of long-term stability and biological activity of emulsion-based nanoadjuvants. **Razim A.**, *Górską S., Olszewski M., Gamian A., Myc A.*
7. Kuźnia Młodych Talentów Akademii Młodych Uczonych 15-18.09.2016 Jabłonna, Polska. Wystąpienie ustne: Na drodze do idealnej donosowej szczepionki. **Razim A.** Stypendium wyjazdowe.
8. 10th Vaccine Congress, 4-7.09.2016 Amsterdam, Holandia. Plakat: Physicochemical and biological characterisation of emulsion-based nanoadjuvants and their potentials in formulation of new generation vaccines. **Razim A.**, *Górską S., Olszewski M., Gamian A., Myc A.*
9. Seminarium IITD PAN, 5.05.2016 Wrocław, Polska. Wykład: Racjonalne podejście do szczepionek donosowych. **Razim A.**

10. 6th International Weigl Conference on Microbiology, 8-10.07.2015 Gdańsk, Polska. Plakat: Evaluation of methods used for isolation of surface proteins of *Clostridium difficile*. **Mehlich A.**, Górska S., Gamian A.
11. 2nd Polish-Czech Probiotics Conference: Microbiology, Immunology & Allergy 24-26.05.2015 Bielawa, Polska. Wystąpienie ustne: Mucosal Immunity and Mucosal Vaccination. Myc A., **Mehlich A.**
12. 2nd Polish-Czech Probiotics Conference: Microbiology, Immunology & Allergy 24-26.05.2015 Bielawa, Polska. Wystąpienie ustne: Methods for isolation of surface proteins of *Clostridium difficile*. **Mehlich A.**, Górska S., Gamian A.
13. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki, VII edycja, 17.01.2015 Wrocław, Polska. Plakat: Nanoadiuwanty – adiuwanty nowej generacji – właściwości i potencjalne zastosowanie. **Mehlich A.**, Myc A., Gamian A.
14. Winter School of Immunology 14-16.11.2014 Polanica Zdrój, Polska. Wykład: Methods used in immunology and biochemistry: 2D electrophoresis, Western Blot and Precision Epitope Mapping (PEPSCAN). **Mehlich A.**

Zgłoszenia patentowe:

1. Zgłoszenie międzynarodowe: „Szczepionka do profilaktyki i leczenia zakażeń *C. difficile* oraz jej zastosowanie.” Myc A., **Razim A.**, Górska S., Gamian A. PCT/IB2019/060389
2. Zgłoszenie polskie: „Szczepionka do profilaktyki i leczenia zakażeń *C. difficile* oraz jej zastosowanie.” Myc A., **Razim A.**, Górska S., Gamian A. P. 428045
3. Zgłoszenie polskie: „Zastosowanie białek powierzchniowych *Clostridium difficile*, kompozycja i jej zastosowanie, przeciwciała oraz sposób diagnozowania zakażeń powodowanych przez *Clostridium difficile*.” **Razim A.**, Górska A., Pacyga K., Gamian A. P. 428048

Udział w realizacji grantów badawczych (od najnowszych):

1. Mobilność naukowa. Wymiana osobowa z Republiką Czeską.

NAWA, nr PPN/BIL/2018/1/00005/U/00001

Kierownik: Sabina Górska

Funkcja pełniona w projekcie: wykonawca

2. Określenie struktury składników ściany komórkowej wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i ich rola w rozwoju chorób o podłożu alergicznym

NCN 2017/26/E/NZ7/01202

Kierownik: Sabina Górska

Funkcja pełniona w projekcie: wykonawca

Lata realizacji: 2018-2023

Finansowanie: 1 534 520 PLN

3. Mapowanie epitopów białek powierzchniowych *Clostridium difficile* oraz charakterystyka właściwości ochronnych koniugatu epitopu z białkiem nośnikowym w połączeniu z nowoczesnym nanoadiuwantem

NCN 2016/21/B/NZ6/02286

Kierownik: Andrzej Gamian

Funkcja pełniona w projekcie: stypendysta

Lata realizacji: 2017-2020

Finansowanie: 766 580 PLN

4. Określenie właściwości antywirusowych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, KNOW

Kierownik: Sabina Górska

Funkcja pełniona w projekcie: wykonawca

Lata realizacji: 2017-2018

Finansowanie 30 000 PLN

5. Charakterystyka fizykochemicznych właściwości prototypu emulsyjnego nanoadjuwantu oraz jego wpływu na pobieranie i obróbkę antygeny przez komórki prezentujące antygen

NCN 2015/17/N/NZ6/03512

Kierownik: Agnieszka Razim

Lata realizacji: 2016-2019

Finansowanie 148 800 PLN

Staże naukowe:

1. 10-14.06.2019 Laboratorium Gnotobiologii Czeskiej Akademii Nauk w Novym Hradku, Czechy. Wyjazd w ramach projektu wymiany bilateralnej (NAWA, nr PPN/BIL/2018/1/00005/U/00001).
2. 1.01-31.05.2017 Uniwersytet Michigan w Ann Arbor, USA. Tytuł projektu: Modulacja odpowiedzi odpornościowej gospodarza i wytworzenie odporności przeciwko *Cryptococcus neoformans* z użyciem nowoczesnych nanoadjuwantów. Staż zrealizowany pod opieką dr hab. M. Olszewskiego, sfinansowany z funduszy KNOW (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego).
3. 1.06-1.09.2012 Uniwersytet w Groningen, Holandia. Praktyki studenckie, tytuł projektu: Dual labeling and FRET analysis of ECF-Thit. Praktyki zrealizowane pod opieką dr D. J. Slotboom, sfinansowane w ramach programu Erasmus praktyki.
4. 1.10.2011-1.02.2012 Uniwersytet w Groningen, Holandia. Projekt badawczy, tytuł projektu: Expression of yeast amino acid transporters using their endogenous promoters. Projekt zrealizowany pod opieką prof. B. Poolman, sfinansowany w ramach programu Erasmus.

Nagrody:

1. Stypendium wyjazdowe - Translational Immunology 26-27.03.2020 Ghent, Belgia.
2. Stypendium im. Ludwika Hirszfelda w zakresie nauk biologicznych i medycznych. Przyznawane przez Prezydenta Wrocławia w ramach Studenckiego Programu Stypendialnego na rok akademicki 2018/2019.
3. Stypendium wyjazdowe - Kuźnia Młodych Talentów Akademii Młodych Uczonych 15-18.09.2016 Jabłonna, Polska.
4. Nagroda Dyrektora Instytutu za działalność promującą Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu 2016.
5. Stypendium dla najlepszych doktorantów przyznawane przez Dyrektora Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, na rok akademicki 2016/2017.