

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



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Badania reaktywności przeciwciał surowicy ludzkiej z bakteryjnym
białkiem OmpC jako markerem humoralnych niedoborów odporności**

Studies on the reactivity of human serum antibodies with the bacterial OmpC
protein as a marker of humoral immunodeficiency

Piotr Naporowski

Promotor

dr hab. Danuta Witkowska

Wrocław, 2023

Składam serdeczne podziękowania:

Dr hab. Danucie Witkowskiej, promotorce niniejszej rozprawy, za przekazaną wiedzę, wszechstronną pomoc i wprowadzenie mnie do pasjonującego świata nauki.

Prof. dr hab. Andrzejowi Gamianowi za cenne konsultacje naukowe oraz za pomoc w planowaniu eksperymentów i analizie otrzymanych wyników.

Dr Aleksandrze Lewandowicz-Uszyńskiej za udostępnienie unikalnego materiału klinicznego oraz wsparcie klinicysty-immunologa.

Moim koleżankom i kolegom z Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych za życzliwą atmosferę sprzyjającą pracy naukowej, a w szczególności:

mgr inż. Michałowi Ochnikowi za pomoc w przygotowaniu niniejszego manuskryptu.

Pani Bernadecie Szostko za pomoc i cenne rady przy przeprowadzaniu eksperymentów.

Dr Katarzynie Kapczyńskiej za pomoc w badaniach spektrometrycznych.

Mgr Annie Chudzik, mgr Paulinie Żebrowskiej-Różańskiej, mgr Dorocie Kujawie, dr Karolinie Filik oraz mgr inż. Samanthcie Filipów za motywację, ciepłe słowa i wsparcie w chwilach zwątpienia.

Rodzinie oraz znajomym za to, że zawsze we mnie wierzyli, wspierali i motywowali do dalszego rozwoju

Pracę tę dedykuję mojej mamie.

Spis treści

Spis treści	3
Wykaz skrótów	6
Streszczenie.....	10
Summary	13
1. Wstęp	16
1.1. Układ odpornościowy	16
1.1.1. Odporność wrodzona (nieswoista).....	17
1.1.2. Odporność nabyta (swoista).....	18
1.2. Pierwotne niedobory odporności (PNO).....	19
1.2.1. Zakażenia bakteryjne towarzyszące niedoborom immunologicznym	23
1.2.2. Infekcje wirusowe towarzyszące pierwotnym niedoborom odporności	29
1.3. Suplementacja immunoglobulin u pacjentów z nieoborami odporności.....	32
1.3.1. Bezpośrednia neutralizacja patogenów przeciwciałami.....	32
1.3.2. Neutralizacja pośrednia	33
1.4. Rodzina <i>Enterobacteriaceae</i>	33
1.4.1. Patogenność <i>Enterobacteriaceae</i>	34
1.4.2. Budowa osłony komórkowej bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	36
1.4.3. Białka błony zewnętrznej	38
1.4.4. Biosynteza białek błony zewnętrznej	38
1.4.5. Budowa i funkcje białek błony zewnętrznej	39
1.5. Badanie reaktywności białek błony zewnętrznej pałeczek <i>Shigella flexneri</i>	41
2. Cele pracy	46
3. Materiały i metody	47
3.1. Materiał kliniczny użyty do badań – surowice krwi pacjentów i honorowych dawców krwi	47
3.2. Szczep bakterii i warunki hodowli	47
3.3. Syntetyczne peptydy zawierające epitop wiążący białka OmpC	48
3.3.1. Peptyd cykliczny o sekwencji [GGLNRYDERYIGK]-C.....	48
3.3.2. Peptyd liniowy o sekwencji GLNRYDERYIGC	49
3.4. Zwierzęta stosowane w badaniach modelowych.....	50
3.5. Surowica myszy z przeciwciałami anty-OmpC z <i>Shigella flexneri</i> 3a	51
3.6. Ekstrakcja białek błony zewnętrznej wg Arcidiacono i wsp.	51

3.7. Oczyszczanie natywnego białka OmpC	52
3.7.1. Filtracja żelowa	52
3.7.2. Chromatografia jonowymienna.....	52
3.8. Oznaczanie białka	52
3.8.1. Metoda Bradford	52
3.8.2. Pomiar absorbancji.....	53
3.9. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	53
3.10. Metody immunoenzymatyczne	54
3.10.1. Przygotowanie surowicy krwi.....	54
3.10.2. Test ELISA.....	55
3.10.3. Transfer białek na membranę Immobilon P oraz oznaczanie ich reaktywności z przeciwciałami za pomocą metody Western Blot	55
3.11. Przygotowanie złoża do chromatografii powinowactwa.....	56
3.11.1. Oczyszczanie swoistych przeciwciał anty-OmpC z surowicy ludzkiej/mysiej z zastosowaniem złoża z immobilizowanym białkiem OmpC	56
3.12. Koniugacja peptydu z białkiem nośnikowym	57
3.12.1. Oznaczanie wolnych grup aminowych na powierzchni białka	57
3.13. Otrzymywanie rekombinowanego białka OmpC <i>S. flexneri</i> 3a w systemie ekspresyjnym <i>E. coli</i>	58
3.13.1. Przygotowanie bakterii kompetentnych	58
3.13.2. Transformacja bakterii kompetentnych metodą szoku termicznego.....	58
3.13.3. Ekspresja białka rekombinowanego w hodowli płynnej.....	58
3.13.4. Sonikacja osadów bakteryjnych	59
3.14. Badania na modelach zwierzęcych	59
3.14.1. Analiza właściwości ochronnych natywnego i rekombinowanego białka OmpC prowadzona na modelu mysim, przy zastosowaniu zakażenia dawką LD ₁₀₀ pałeczek <i>Shigella flexneri</i> 3a.....	59
3.14.2. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami <i>Shigella flexneri</i> 3a w dawce LD ₁₀₀	60
3.14.3. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami <i>Shigella flexneri</i> 3a w dawce LD ₅₀	61
3.15. Analiza MALDI-TOF-MS	63
3.16. Oczyszczanie monomeru albuminy surowicy bydlęcej (BSA)	63

3.17. Metody statystyczne	63
4. Wyniki.....	65
4.1. Hodowla pałeczek <i>Shigella flexneri</i> 3a	65
4.2. Ekstrakcja białek błony zewnętrznej pałeczek <i>Shigella flexneri</i> 3a	65
4.3. Oczyszczanie białka OmpC	67
4.3.1. Filtracja żelowa	68
4.3.2. Chromatografia jonowymienna.....	70
4.3.3. Wydajność oczyszczania białka OmpC	71
4.4. Oczyszczanie monomeru albuminy surowicy bydłowej (BSA).....	72
4.5. Koniugacja peptydów z białkiem nośnikowym	74
4.6. Synteza koniugatu BSA-peptyd.....	74
4.7. Uzyskanie swoistych przeciwciał anti-OmpC z użyciem chromatografii powinowactwa do immobilizowanego białka OmpC na kolumnie ze złożem Sepharose CL-4B	76
4.8. Otrzymanie i oczyszczenie rekombinowanego białka OmpC.....	81
4.9. Reaktywność i miana przeciwciał anti-OmpC surowicy ludzkiej z wybranymi antygenami.....	86
4.9.1. Oznaczanie miana przeciwciał anti OmpC klasy IgA testem ELISA	86
4.9.2. Oznaczanie miana przeciwciał klasy IgG testem ELISA.....	102
4.10. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych.....	114
4.10.1. Analiza właściwości ochronnych natywnego i rekombinowanego białka OmpC przeprowadzona na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia dawką LD ₁₀₀ pałeczek <i>Shigella flexneri</i> 3a.....	115
4.10.2. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał anti-OmpC w badaniach modelowych na myszach przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami <i>Shigella flexneri</i> 3a w dawce LD ₁₀₀	118
5. Dyskusja.....	125
6. Wnioski	135
7. Bibliografia	137
Wykaz tabel	148
Wykaz rycin	151
Osiągnięcia i działalność naukowa	154

Wykaz skrótów

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
ADA	Adenosine Deaminase	Deaminaza adeninowa
ADCC	Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity	Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
AI	Autoinducer	Autoinduktor
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome	Autoimmunologiczny zespół limfoproliferacyjny
AP	Ammonium persulfate	Nadsiarczan amonu
APC	Antigen presenting cell	Komórka prezentująca antygen
APECED	Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy	Zespół autoimmunologiczny wielogruzołowy z kandydozą i dystrofią ektodermalną
API-4	Autoinducing peptide 4	Autoindukowany peptyd 4
APS	Ammonium persulfate	Nadsiarczan amonu
APS-1	Autoimmune Polyendocrine Syndrome type 1	Autoimmunologiczny zespół wielogruzołowy typu 1
ARA	Autosomal Recessive Agammaglobulinemia	Autosomalna recesywna agammaglobulinemia
ATP	Adenosine triphosphate	Adenozyno-5'-trifosforan
AXL	X-linked agammaglobulinemia	Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X
BALB/c	Mouse strain Bagg albino	Szczep myszy "Bagg albino"
BamA/B/C/D	Outer Membrane β -Barrel Protein	β -baryłka białka błony zewnętrznej
BCG	Bacillus Calmette-Guérin	Szczepionka BCG
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt	Sól p-toluidyny 5-bromo-4-chloro-3'-indolifosforanu
BHI	Brain Heart Infusion	Pożywka z wyciągu mózgowo-sercowego
BSA	Bovine Serum Albumin	Albumina surowicy wołowej
BtuB	Outer Membrane Cobalamin Transporter	Transporter kobalaminy z błony zewnętrznej
CD4+	Cluster of differentiation	Antygen różnicowania komórkowego
CGD	Chronic Granulomatous Disease	Przewlekła choroba ziarniniakowa
CLR	C-type lectin receptors	Receptor lektynowy typu C
CMV	Cytomegalovirus	Cytomegalowirus
CRP	C-reactive protein	Białko C-reaktywne
CSR	Class Switch Recombination	Przełączanie klas przeciwciał
CVID	Common variable immunodeficiency disorders	Pospolite zmienne niedobory odporności
CW	Cell Wall	Ściana komórkowa
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns	Struktury molekularne związane z uszkodzeniem
DC	Dendritic cell	Komórki dendrytyczne
DegP	Periplasmic serine endoprotease DegP	Periplazmatyczna endoproteaza serynowa DegP
DIRA	Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist	Deficyt antagonisty receptora dla IL-1
DNA	deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
EBV	Epstein-Barr virus	Wirus Epsteina-Barr

ECHO	Enteric cytopathogenic human orphan viruses	Ludzkie jelitowe cytopatogenne wirusy sieroce
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kwas wersenowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Test immunoenzymatyczny
ER	Endoplasmic reticulum	Retikulum endoplazmatyczne
ESID	European Society for Immunodeficiencies	Europejskie Towarzystwo Niedoborów Odporności
EVER	Epidermodyplasia verruciformis	Dysplazja Lewandowsky'ego-Lutza
FadL	Porin FadL	Poryna FadL
FecA	Active transport protein FecA	Białko transort aktywnego FecA
FEMS	Federation of European Microbiological Societies	Europejska Federacja Towarzystw Mikrobiologicznych
FepA	Active transport protein FepA	Białko aktywnego transportu FepA
FHL	Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis	Rodzinna limfohistiocytoza
FhuA	Active transport protein FhuA	Białko aktywnego transportu FhuA
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa białek
FWI	Formic acid: water: isopropanol	Kwas mrówkowy: woda: izopropanol
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factors	Czynnik stymulujący tworzenia kolonii granulocytów
HBV	Hepatitis B virus	Wirus zapalenia wątroby typu B
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid	Kwas α -cyano-4-hydroksycynamonowy
HIES	Hyper-IgE Syndrome	Zespół Hiper IgE
HIV	Human immunodeficiency virus	Ludzki wirus niedoboru odporności
HPV	Human papillomavirus	Wirus brodawczaka ludzkiego
HRV	Human Rhinovirus	Ludzki rinowirus
HSE	Herpes Simplex Encephalitis	Opryszczkowe zapalenie mózgu
HSV	Herpes simplex virus	Wirusy opryszczki pospolitej
IFN	Interferone	Interferon
Ig	Immunoglobulin	Immunoglobulina
IITD	Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej	Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy
IL	Interleukin	Interleukina
IM	Inter membrane	Błona wewnętrzna
InvA	Invasion protein InvA	Białko inwazyjne InvA
Ipa	Ipa protein	Białko Ipa
IPEX	Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-Linked syndrome	Sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej
IPTG	Izopropylo- β -D-1-tiogalaktopiranozyd	Izopropylo- β -D-1-tiogalaktopiranozyd
IRAK-4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	Kinaza 4 związana z receptorem interleukiny 1
IUIS	International Union of Immunological Societies	Międzynarodową Unię Towarzystw Immunologicznych
IVIG	Intravenous Immunoglobulin	Dożylne preparaty immunoglobulin
kDa	Kilodalton	Kilodalton
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency	Niedobór adhezji leukocytów

LamB	Passive transport protein LamB	Białko biernego transportu LamB
LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
LcrD	Regulatory protein LcrD	Białko regulatorowe LcrD
LD	Lethal Dose	Dawka śmiertelna
LPS	lipopolysaccharide	Lipopolisacharyd
LptD	LPS-assembly protein LptD	Białko LptD składające LPS
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight – Mass Spectrometry	Spektrometria mas wykorzystująca jonizację próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy, połączoną z pomiarem czasu przelotu jonów
MER	Mer tyrosine kinase	Kinaza tyrozynowa Mer
MHC	Major Histocompatibility Complex	Główny układ zgodności tkankowej
MPO	Myeloperoxidase Deficiency	Niedobór mieloperoksydazy
Mxi	Mxi protein	Białko Mxi
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride	Chlorek błękitu nitrotetrazolowego
NK	Natural Killer	Komórka NK
NODD-LRR	Nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeat	Bogata w leucynę domena oligomeryzacji wiążąca nukleotyd
NZDO	Recurrent Respiratory Tract Inflammation	Nawracające zapalenia dróg oddechowych
OM	Outer mambrane	Błona zewnętrzna
Omp	Outer Membrane Protein	Białko błony zewnętrznej
OMPLA	Outer membrane phospholipase A1	Fosfolipaza A1 błony zewnętrznej
PagP	Lipid A palmitoyltransferase PagP	Palmitoyltransferaza lipidu A PagP
PAMP	Patogen-Associated Molecular Patterns	Wzorce molekularne związane z patogenami
PCM	Polish Collection of Microorganisms	Polska Kolekcja Mikroorganizmów
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PgtE	Outer membrane protease E	Proteaza E błony zewnętrznej
PhoE	Outer membrane porin PhoE	Poryna błony zewnętrznej PhoE
PNO (PID)	Primary Immunodeficiency Diseases	Pierwotne niedobory odporności
PNP	Purine Nucleoside Phosphorylase	Fosforylaza nukleozydów purynowych
pNPP	p-nitrophenylphosphate	Fosforan para-nitrofenylu
POTRA	Polypeptide Translocation Associated Domain	Domena związana z translokacją polipeptydu
PRR	Pattern Recognition Receptors	Receptory rozpoznawania wzorców
PVDF	Polyvinylidene difluoride	Difluorek poliwinylidylu
RAG	Recombination Activating Gene	Gen aktywujący rekombinację
RCKiK	Regional Center for Blood Donation and Blood Therapy	Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
RLR	RIG-I-Like Receptors	Receptor RIG-I-podobny
rpm	Revolutions per minute	Obroty na minutę
RSV	Respiratory syncytial virus	Syncytialny wirus oddechowy
RTG	Radioisotope Thermoelectric Generator	Zdjęcie rentgenowskie
RZS	Rheumatoid arthritis	Reumatoidalne zapalenie stawów

SAD	Specific antibody deficiency	Niedobór swoistych przeciwciał
SB	Sample Buffer	Bufor do prób
SB	Super Broth	Super bulion
SCID	Severe Combined Immunodeficiency	Ciężki złożony niedobór odporności
SCN	Severe Congenital Neutropenia	Ciężka wrodzona neutropenia
ScrY	Sucrose-specific porin ScrY	Poryna sacharozo specyficzna ScrY
SD	Standard deviation	Odchylenie standardowe
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Laurylosiarczan sodu
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Elektroforeza w warunkach denaturujących
Sec	Translocase Sec	Translokaza Sec
Skp	Chaperone Skp	Białko opiekuńcze Skp
Spa	Protein Spa	Białko Spa
STAT	Signal Transducer Activator Transcription	Przebieg sygnału i aktywator transkrypcji
SurA	Chaperone SurA	Białko opiekuńcze SurA
TAM	Tumor-associated macrophages	Makrofagi związane z nowotworem
TBS-T	Tris-Buffered Saline, 0,05% Tween 20	Bufor trisowy z 0,05 % Tween 20
TCA	Trichloroacetic acid	Kwas trichlorooctowy
TEMED	Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
TIM	T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain	Domena immunoglobuliny i domena mucyny limfocyta T
TLR	Toll-Like Receptors	Receptor Toll-podobny
TNF	Tumor Necrosis Factor	Czynnik martwicy guza
TRAF3	TNF receptor-associated factor	Czynnik związany z receptorem TNF
TT	Tetanus toxoid	Toksoid tężcowy
TYRO3	Tyrosine-protein kinase receptor	Receptorowa kinaza tyrozynowa
UNC-93	B1 protein homolog	Homolog białka B1
Vir	Vir protein	Białko Vir
VZV	Varicella zoster virus	Wirus ospy wietrznej i półpaśca
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia
WZW A	Hepatitis A Virus	Wirus zapalenia wątroby typu A
XLA	X-Linked Agammaglobulinemia	Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X
ZZSK	Ankylosing spondylitis	Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa

Streszczenie

Badania reaktywności przeciwciał surowicy ludzkiej z bakteryjnym białkiem OmpC jako markerem humoralnych niedoborów odporności

Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* są patogenami wywołującymi biegunki, dur brzuszny, czerwonkę bakteryjną i inne schorzenia jelitowe. Te drobnoustroje stanowią problem, zwłaszcza w krajach rozwijających się, gdzie powodują najwięcej zakażeń kończących się śmiercią. Do zakażeń dochodzi zazwyczaj drogą pokarmową poprzez skażoną bakteriami żywność i wodę, ale także przez kontakty osobiste. Dlatego, w czasach kiedy znacząco wzrósł poziom migracji ludności, jesteśmy niewątpliwie bardziej narażeni na kontakty z patogenami. Najczęściej zakażeniom ulegają dzieci, osoby starsze oraz ludzie, których układ odpornościowy nie funkcjonuje prawidłowo. W skutecznym leczeniu zakażeń bakteryjnych ogromnym problemem jest pojawianie się szczepów opornych na antybiotyki i inne leki przeciwdrobnoustrojowe. W podjęciu skutecznego leczenia ważny jest dobór odpowiednich leków i jak najszybsze rozpoczęcie terapii. Stosowane metody w laboratoriach diagnostycznych wymagają zarówno nakładów finansowych jak i czasowych, co zdecydowanie utrudnia walkę z tymi patogenami.

Człowiek z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym zdecydowanie lepiej radzi sobie z patogenami niż osoba, której układ odpornościowy działa wadliwie, a pacjenci cierpiący na pierwotne niedobory odporności (PNO) są zdecydowanie bardziej narażeni na infekcje. Pierwotne niedobory odporności, to grupa chorób przejawiających się wadami w funkcjonowaniu układu odpornościowego o podłożu genetycznym. Wśród PNO najczęściej występującymi są te związane z niedoborem przeciwciał, 1 przypadek na 300 do 500 żywych urodzeń.

Przez defekty układu immunologicznego infekcje rozwijają się szybciej, trudniej poddają się leczeniu i często nawracają. Terapia stosowana przy niedoborach przeciwciał opiera się na profilaktycznej lub interwencyjnej antybiotykoterapii, szczepieniach ochronnych, leczeniu substytucyjnym (preparatami immunoglobulin, składników dopełniacza, czynników wzrostu) lub przeszczepach szpiku. Najskuteczniejszym, najmniej inwazyjnym i najbezpieczniejszym sposobem walki z patogenami, jest leczenie dożylnie preparatami immunoglobulin (IVIG – intravenous immunoglobulin) lub w postaci iniekcji podskórnych. Zapobieganie infekcjom oraz leczenie, poprzez suplementację brakujących przeciwciał, jest bardzo obiecującą terapią dla wielu chorych, także tych cierpiących na zakażenia towarzyszące pierwotnym oraz wtórnym niedoborom odporności.

Czynnikiem etiologicznym, zakażeń występujących u pacjentów z PNO, są często bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, m.in. bakterie z rodzaju *Shigella*. Przyczyną infekcji tego typu są pałeczki *Shigella flexneri* i *Shigella sonnei*, które wywołują shigellozy, czerwonkę bakteryjną, czy zapalenie okrężnicy. U ludzi z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, zakażenia te mogą ustępować samoistnie, bądź po podaniu antybiotyku. Natomiast pacjentów z niedoborami znacznie trudniej jest skutecznie wyleczyć i często zakażenia nawracają, powodując ciężkie zapalenia błon śluzowych odbytu i jelit, którym towarzyszą krwawe i ropne biegunki.

W skutecznym leczeniu wielu infekcji, także jelitowych, ważne jest jak najszybsze określenie patogenu stanowiącego czynnik etiologiczny zakażenia oraz szybkie wdrożenie terapii. W przypadku pacjentów z PNO, możemy zdiagnozować niedobór danych przeciwciał przed wystąpieniem zakażenia i poprzez ich suplementację zapobiec infekcji, a kiedy już do niej doszło, ułatwić w ten sposób leczenie.

Wśród pacjentów z niedoborami humoralnymi są osoby, u których ogólny poziom immunoglobulin jest na właściwym poziomie, a jednak obserwuje się u nich uporczywe zakażenia o charakterze nawracającym, nie poddające się leczeniu w konwencjonalny sposób. Taki obraz kliniczny sugeruje niedobór swoistych przeciwciał (SAD – Specific Antibody Deficiency), czyli przeciwciał skierowanych na konkretny antygen/patogen. Wynikiem testu do oznaczania SAD musi być określone miano przeciwciał anti-OmpC z *Shigella flexneri*, które będzie wskazywało na niedobór.

W celu opracowania takiego testu, obok natywnego białka OmpC, zsyntezowano koniugaty białkowe na bazie białka BSA i peptydu cyklicznego/liniowego zawierającego sekwencję aminokwasową wiążącą białka OmpC. Przy pomocy tych trzech antygenów oznaczono miana przeciwciał testem ELISA u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności (PNO) i pacjentów z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych (NZDO) oraz u osób zdrowych. Analiza porównawcza średnich mian swoistych przeciwciał anti-OmpC (IgA, IgG) wśród badanych grup daje możliwość opracowania testu serologicznego pozwalającego diagnozować humoralne niedobory odporności.

Wcześniejsze badania prowadzone w naszym zespole pozwoliły na stwierdzenie obecności w surowicy krwi pępowinowej przeciwciał anti-OmpC z *Shigella flexneri*. Przeciwciała występujące we krwi pępowinowej przekazywane są dziecku przez matkę, co może sugerować, że mają one charakter ochronny. W celu potwierdzenia tej tezy zaprojektowano doświadczenie protekcyjne na modelu mysim. Przeciwciała do testu na zwierzętach pozyskiwano z surowicy ludzkiej/mysiej na drodze chromatografii

powinowactwa na złożu z immobilizowanym białkiem OmpC. Zwierzęta immunizowano biernie przeciwciałami ludzkimi lub mysimi anti-OmpC, a następnie zakażano je pałeczkami *Shigella flexneri* 3a. Otrzymane wyniki potwierdziły ochronne działanie izolowanych przeciwciał anti-OmpC, co stanowi podstawę do opracowania terapeutyku suplementującego niedobory przeciwciał.

Badania reaktywności natywnego białka OmpC, rekombinowanego białka OmpC oraz koniugatów białkowych BSA-peptyd cykliczny/liniowy zawierających sekwencję wiążącą białka OmpC stanowią ważną podstawę do badań nad opracowaniem testu do oznaczania swoistych niedoborów przeciwciał oraz terapeutyku suplementującego niedobory tych przeciwciał,

Summary

Studies on the reactivity of human serum antibodies with the bacterial OmpC protein as a marker of humoral immunodeficiency

Gram-negative rods of the *Enterobacteriaceae* family are pathogens that cause diarrhea, typhoid fever, bacillary dysentery and other intestinal diseases. These microbes are a problem, especially in developing countries, where they cause the most fatal infections. Infections usually occur through the oral route through contaminated food and water, but also through personal contact. Therefore, at a time when the level of population migration has significantly increased, we are undoubtedly more exposed to contact with pathogens. Children, the elderly and people whose immune systems are not functioning properly are most often infected. In the effective treatment of bacterial infections,

the emergence of strains resistant to antibiotics and other antimicrobial drugs is a huge problem. To undertake effective treatment, it is important to choose the right drugs and start therapy as soon as possible. The methods used in diagnostic laboratories require both financial and time expenditure, which makes the fight against these pathogens much more difficult.

A person with a properly functioning immune system is much better at dealing with pathogens than an individual whose immune system is malfunctioning, and patients suffering from primary immunodeficiencies (PIDs) are more exposed to infections. Primary immunodeficiencies are a group of diseases manifested by defects in the functioning of the immune system of genetic origin. Among PIDs, those associated with antibody deficiency are the most common, with 1 case per 300 to 500 live births.

Due to defects in the immune system, infections develop faster, are more difficult to treat and often recur. The therapy used for antibody deficiencies is based on prophylactic or interventional antibiotic therapy, vaccinations, substitution treatment (with immunoglobulins, complement components, growth factors) or bone marrow transplants. The most effective, least invasive and safest way to fight pathogens is treatment with intravenous immunoglobulin preparations (IVIG – intravenous immunoglobulin) or in the form of subcutaneous injections. Infection prevention and treatment through the supplementation of missing antibodies is a very promising therapy for many patients, including those suffering from infections accompanying primary and secondary immunodeficiencies.

The etiological factor of infections occurring in PID patients are often bacteria from the *Enterobacteriaceae* family, e.g. bacteria of the genus *Shigella*. The cause of this type of infection is *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei*, which cause shigellosis, bacillary dysentery, and colitis. In people with a properly functioning immune system, these infections may resolve spontaneously or after administration of an antibiotic. On the other hand, patients with deficiencies are much more difficult to treat effectively and infections often recur, causing severe inflammation of the mucous membranes of the anus and intestines, accompanied by bloody and purulent diarrhea.

In the effective treatment of many infections, including intestinal infections, it is important to determine the pathogen that is the etiological factor of the infection as soon as possible and to quickly implement the therapy. In the case of patients with PID, we can diagnose the deficiency of specific antibodies before the infection occurs and, by supplementing them, prevent infection, and when it has occurred, thus facilitating treatment.

Among the patients with humoral deficiencies, there are those whose general immunoglobulin levels are at the appropriate level, but persistent, recurrent infections that do not respond to conventional treatment are observed. This clinical picture suggests a deficiency of specific antibodies (SAD), i.e. antibodies directed to a specific antigen/pathogen. The result of the SAD assay must be an anti-OmpC *Shigella flexneri* antibody titre indicating a deficiency.

To develop such an assay, in addition to the native OmpC protein, protein conjugates were synthesized based on the BSA protein and a cyclic/linear peptide containing the binding aminoacids sequence of the OmpC protein. With the help of these three antigens, antibody titers were determined by ELISA in patients with primary immunodeficiencies (PIDs) and patients with recurrent respiratory tract infections (RPIs) and in healthy individuals. Comparative analysis of mean specific antibody titres among the studied groups makes it possible to develop a serological test to diagnose humoral immunodeficiencies.

Previous research conducted by our team allowed us to confirm the presence of anti-OmpC antibodies from *Shigella flexneri* in umbilical cord blood serum. The antibodies found in umbilical cord blood are passed on to the baby by the mother, which may suggest that they are protective. To confirm this thesis, a protection experiment was designed on a mouse model. The antibodies for the animal test were obtained from human/mouse serum by affinity chromatography on immobilized OmpC protein. Animals

were passively immunized with human or mouse anti-OmpC antibodies and then infected with *Shigella flexneri* 3a. The obtained results confirmed the protective effect of isolated anti-OmpC antibodies, which is the basis for the development of therapeutic supplementing antibody deficiencies.

Reactivity studies of the native OmpC protein, recombinant OmpC protein and BSA protein conjugates – linear/cyclic peptide containing the OmpC protein binding sequence are an important basis for research on the development of a test for determining specific antibody deficiencies and a therapeutic supplementing these antibodies deficiencies.

1. Wstęp

1.1. Układ odpornościowy

W toku ewolucji organizmy żywe wykształciły cechy przystosowawcze, które umożliwiały im przeżycie i rozwój w zmieniającym się świecie. Patogeny wykazują krótki okres rozwoju, co sprzyja występowaniu mutacji, które mogą być przyczyną zwiększania ich zjadliwości. Dlatego układ odpornościowy człowieka musi być w ciągłej gotowości do podjęcia walki z każdym rodzajem niebezpieczeństwa, jakim może być rozwój patogenu czy nowotworu. W okresie dojrzewania układu odpornościowego, wykształca on mechanizmy, które warunkują tolerancję na własne komórki i tkanki. Jego istotnym zadaniem jest rozpoznanie tego co „obce”, a następnie unieszkodliwienie i eliminacja potencjalnego zagrożenia [58, 130]. Wykrycie patogenu przez komórki układu odpornościowego prowadzi do wykształcenia mechanizmu udoskonalającego jego działanie, aby przy następnej infekcji podjąć szybkie i skuteczne działania związane z jego eliminacją [32, 71]. W czasie oddziaływań komórek układu odpornościowego z patogenem powstają również autoreaktywne komórki B i T, które są skutecznie eliminowane w procesie apoptozy lub poddawane są supresji przez regulatorowe komórki T. Główny układ zgodności tkankowej (MHC – Major Histocompatibility Complex) odpowiada za wiązanie i prezentację antygenów limfocytom T, a receptory na limfocytach T i B są zdolne do rozpoznawania czynników infekcyjnych [32, 130].

Układ immunologiczny człowieka, jako złożony system funkcjonalnie połączonych narządów umożliwiających działanie mechanizmom odporności, warunkuje prawidłowe funkcjonowanie organizmu w środowisku. Na ogólną odporność organizmu składają się dwa wzajemnie uzupełniające się mechanizmy stanowiące system zabezpieczeń przed zakażeniem (Tabela 1). Jeden z nich to starsza ewolucyjnie odporność wrodzona (nieswoista), stanowiąca pierwszą linię obrony w walce z patogenami. Drugim mechanizmem obrony jest odporność nabyta (swoista), która jest udoskonalana w trakcie całego życia. Obydwa rodzaje odporności współpracują ze sobą na drodze bezpośredniego kontaktu lub przez mediatory, co umożliwia sprawną i skuteczną obronę przed zakażeniem [110]. Układ odpornościowy ma duże możliwości generowania zmienności różnych receptorów na powierzchni limfocytów T czy immunoglobulin.

Różnice	Odporność wrodzona (nieswoista)	Odporność nabyta (swoista)
aktywacja wstępna	brak	niezbędna
szybkość odpowiedzi układu odpornościowego	bardzo szybki rozwój (minuty)	powolny (do tygodnia)
pochodzenie receptorów	niezmienne, dziedziczone, niespecyficzne	powstają <i>de novo</i> przez rearanżację genów na skutek kontaktu z nowym antygenem. nie podlegają dziedziczeniu
typ receptorów	TLR (toll-like) lektynowe scavenger receptory komórek NK	swoiste względem patogenu
rozpoznanie antygeny	nieswoiste, LPS, kwasy nukleinowe	swoiste dla danych struktur patogenu
komórki	NK, DC, limfocyty $\gamma\delta$ T i B-1a, makrofagi, granulocyty	APC, limfocyty T (CD4+, CD8+) i limfocyty B
ekspansja	nieklonalna	klonalna
pamięć immunologiczna	brak	trwała
mechanizmy efektorowe	cytotoksyczność (niezależna od MHC) zależna od NK, makrofagów, DC, komplementu, wytwarzanie cytokin (IFN α , β i γ , TNFs, interleukiny, chemokiny)	cytotoksyczność limfocytów TCD8+ zależna od MHC, cytotoksyczność oparta na komplementcie, zależna od przeciwciał, aktywności cytokin

Tabela 1. Charakterystyka zasadniczych cech i występujących różnic między odpornością wrodzoną i nabytą [48].

1.1.1. Odporność wrodzona (nieswoista)

Odporność wrodzona angażuje wiele rodzajów komórek, które bardzo szybko reagują na pojawienie się patogenu. Jej działanie nie zależy od tego czy spotkaliśmy się już wcześniej z danym patogenem czy też nie, jest szybka i nie wymaga dużego nakładu energii [111]. Ponadto nie potrzebuje wcześniejszej aktywacji, prowadzi do intensywnej odpowiedzi zapalnej i nie uszkadza własnych komórek organizmu. Chociaż nie pozostawia trwałej pamięci immunologicznej, często jest wystarczająca do całkowitego wyeliminowania zagrożenia wywołanego przez patogen [131].

Odporność nieswoista w działaniu obronne angażuje skórę z jej mikroflorą bakteryjną oraz czynniki komórkowe. Takimi komórkami są np. komórki NK (NK – Natural Killer), które likwidują zainfekowane komórki organizmu, komórki fagocytyczne jak komórki dendrytyczne, makrofagi, neutrofile, które wchłaniają i zabijają drobnoustroje chorobotwórcze. W skład tego typu odpowiedzi wchodzi również niektóre leukocyty, jak eozynofile czy bazofile i komórki tuczne uwalniające czynniki prozapalne, toksyczne dla patogenów.

Receptory PRR (PRR – Pattern Recognition Receptors) rozpoznają konserwatywne molekularne wzorce charakterystyczne wyłącznie dla czynników chorobotwórczych, będące węglowodanami, peptydoglikanami, kwasami nukleinowymi, białkami (peptydami) czy lipoproteinami [121]. PRR mogą występować zarówno na powierzchni drobnoustroju, jak i w cytoplazmie. Na powierzchni wirusów, grzybów, pasożytów czy bakterii rozpoznają cząsteczki PAMP (PAMP – Patogen-Associated Molecular Patterns), takie jak LPS (LPS – lipopolisacharyd), OMP (OMP – Outer Membrane Protein) czy kwas lipotejchowy. PRR rozpoznają również DAMP (DAMP – Damage-Associated Molecular Patterns) będące wewnątrzkomórkowymi sygnałami „niebezpieczeństwa”. Zadaniem receptorów rozpoznających wzorce, jest rozpoczęcie kaskady stanu zapalnego, związanej z wytwarzaniem różnych cytokin prozapalnych jak IL-1, IL-6 czy TNF- α oraz czynników chemotaktycznych, które wspomagają zwalczanie zakażenia oraz aktywowanie odpowiedzi swoistej [44, 91, 102].

1.1.2. Odporność nabyta (swoista)

Odporność nabyta (adaptacyjna) jest aktywowana po rozpoznaniu patogenu. Rozwija się powoli, a jej maksymalna aktywność utrzymuje się 3–5 dni. Jest wysoce swoista względem patogenu, charakteryzuje ją pamięć immunologiczna i działa podobnie jak odporność nieswoista poprzez czynniki komórkowe i humoralne. Do czynników humoralnych należą antytoksyny, opsoniny, przeciwciała, natomiast do czynników komórkowych cytotoksyczne limfocyty T, pomocnicze komórki T. Odporność nabyta, oparta jest na mechanizmie pamięci. Podczas ekspozycji na nową cząsteczkę i rozpoznając ją jako obcą, wywołuje swoistą reakcję obronną, która przy ponownym spotkaniu z danym antygenem może być bardzo szybko aktywowana.

Komórkami zaangażowanymi w odporność nabytą są głównie limfocyty T i B. Te pierwsze zaangażowane są w eliminację patogenów wewnątrzkomórkowych i wytwarzają cytokiny wspomagające inne komórki układu odpornościowego w walce z

drobnoustrojami chorobotwórczymi. Limfocyty B wspomagają funkcjonowanie komórek fagocytarnych oraz wytwarzają przeciwciała. W zwalczaniu zakażenia ogromne znaczenie mają wszystkie wcześniej wymienione komórki oraz ich wzajemne oddziaływanie. Komórki prezentujące antygen limfocytom, a następnie selekcja klonalna tych antygenów, stymulują odpowiedź oraz wytwarzanie przeciwciał. Podczas infekcji jednymi z pierwszych objawów stanu zapalnego są zaczerwienienie, obrzęk, ból, podwyższona temperatura, które są konsekwencją działania wcześniej uruchomionej odporności wrodzonej [111].

Sprawnie działający układ odpornościowy jest odpowiednio przygotowany do walki z patogenami. Jego poszczególne składniki oraz ich wzajemne oddziaływania chronią organizm przed rozwojem zakażenia, a zaburzenia dotyczące któregośkolwiek z elementów mogą skutkować nieefektywnym działaniem tego układu [16]. W takim przypadku organizm nie jest odpowiednio chroniony i wskutek tego może dochodzić do uporczywych, nawracających infekcji. Brak skutecznej ochrony przed zakażeniem, może wynikać z upośledzenia układu immunologicznego określanego jako niedobór odporności [53, 77].

1.2. Pierwotne niedobory odporności (PNO)

Europejskie Towarzystwo Niedoborów Odporności (ESID – European Society for Immunodeficiencies) oraz Fundacja Jeffreya Modella (Jeffrey Modell Foundation) wraz z Grupą Ekspertów opisali 10 ostrzegawczych objawów u dzieci (<http://www.info4pi.org/>) i 6 ostrzegawczych objawów u dorosłych, a wystąpienie przynajmniej jednego z nich sugeruje pierwotny niedobór odporności (PNO) (Tabela 2) [73]. Należy jednak pamiętać, że człowiek może kilka razy do roku przechodzić łagodne infekcje dróg oddechowych i takie spostrzeżenie dodatkowo utrudnia diagnostykę PNO (PID – Primary Immunodeficiency Diseases).

Pierwotne niedobory odporności należy podejrzewać u osób, u których wystąpił którykolwiek z objawów opisanych w Tabeli 2 oraz u osób, u których wywiad osobniczy lub rodzinny wskazuje na tego typu schorzenia. W diagnostyce PNO ważne jest również badanie fizykalne pokazujące reprezentatywne dla niektórych typów niedoborów oznaki, takie jak charakterystyczne cechy dysmorficzne, neurologiczne – cechy ataksji, zmiany skórne, zapalenie spojówek, osłabienie i wypadanie włosów. Jednak najważniejsze w stwierdzeniu pierwotnego niedoboru odporności są badania laboratoryjne (immunologiczne, genetyczne, serologiczne). Właściwie i szybko postawiona diagnoza

oraz niezwłoczne wdrożenie terapii, zmniejsza ryzyko występowania zakażeń o ciężkim przebiegu i zwiększa szanse pacjenta na normalne życie [23, 77, 89].

Pierwotne niedobory odporności zaliczają się do chorób rzadkich, występują średnio z częstością 1 przypadek na 10000 żywych urodzeń (wartość graniczna w krajach Unii Europejskiej, to 1 na 2000). Ze względu na sporadyczne występowanie ich wykrycie często jest opóźnione, a część z nich rozpoznana jest dopiero w wieku dorosłym. Najczęściej występującym z pośród PNO jest niedobór przeciwciał klasy IgA od 1:200 do 1:500 [20, 30, 86, 115].

10 ostrzegawczych objawów PNO u dzieci	6 ostrzegawczych objawów PNO u dorosłych
cztery lub więcej ropnych zakażeń uszu w ciągu roku	cztery lub więcej zakażeń w ciągu roku wymagających antybiotykoterapii
dwa lub więcej zakażeń zatok o ciężkim przebiegu w ciągu roku	zakażenia wymagające długotrwałego stosowania antybiotyków lub zakażenia o charakterze nawracającym
trwająca dwa miesiące lub dłużej antybiotykoterapia bez wyraźnej poprawy	dwa lub więcej ciężkich zakażeń bakteryjnych (zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie kości, posocznica, zapalenie skóry)
dwa lub więcej zapaleń płuc w ciągu roku	dwa lub więcej zapaleń płuc w ciągu 3 lat, potwierdzonych badaniem RTG
zahamowanie prawidłowego rozwoju dziecka lub przyrostu masy ciała	zakażenie z nietypową lokalizacją lub spowodowane nietypowym patogenem
powtarzające się głębokie ropnie skórne lub narządowe	wywiad rodzinny wskazujący na PNO
przewlekająca się grzybica jamy ustnej i skóry powyżej 1-go roku życia	
konieczność długotrwałego stosowania antybiotyków dożylnych dla opanowania zakażenia	
dwa lub więcej ciężkich zakażeń jak: zapalenia mózgu, kości, mięśni, skóry lub posocznica	
wywiad rodzinny, wskazujący na pierwotne niedobory odporności	

Tabela 2. Kliniczne objawy pierwotnych niedoborów odporności u dzieci (wg Fundacji Jeffrey'a Modella z Grupą Ekspertów) (<http://www.info4pi.org/>) i u dorosłych (wg WHO).

PNO to grupa chorób uwarunkowanych genetycznie, charakteryzujących się upośledzeniem jednego lub kilku mechanizmów odporności wrodzonej lub nabytej, w wyniku których dochodzi do zaburzeń budowy, dojrzewania, funkcjonowania i różnicowania się komórek i białek układu odpornościowego [5, 97]. Tego typu zaburzenia powodują, że pacjenci często zapadają na ciężkie i nawracające zakażenia o różnorodnej etiologii. W dodatku niski poziom wiedzy na temat chorób rzadkich może powodować, że pacjenci, których obecnie w krajach UE jest ponad 7%, nie zawsze mają dostęp do odpowiedniej opieki medycznej. Późne lub błędne postawienie diagnozy może skutkować znacznym pogorszeniem się stanu zdrowia pacjenta, a nawet jego śmiercią [97].

Wadliwie działający układ odpornościowy nie jest w stanie prawidłowo kontrolować rozwoju zakażenia w organizmie, a to z kolei może prowadzić do znacznych uszkodzeń w obrębie wielu narządów i układów, tj. płuc, serca, przewodu pokarmowego, układu ruchu, czy układu nerwowego. Ponadto, u części pacjentów z PNO obserwuje się opóźniony rozwój fizyczny, pierwotnie jak w zespołach Nijmegen czy SCID (SCID – Severe Combined Immunodeficiency) lub wtórnie, w następstwie zakażeń o ciężkim przebiegu. Obecnie rozpoznaje się 250 rodzajów PNO, lecz ich liczba stale rośnie [2]. Rozwój diagnostyki immunologicznej i molekularnej pomógł zrozumieć patomechanizmy wielu schorzeń oraz umożliwił poznanie licznych mutacji w genach, które prowadzą do wrodzonych defektów odporności. Genetyczne podstawy PNO są bardzo zróżnicowane, od wrodzonych i związanych z mutacjami w obrębie chromosomu X [9], do dziedziczonych autosomalnie recesywnie czy dziedziczonych jednogennie [16]. Niekiedy w obrębie tej samej choroby obserwuje się różny przebieg kliniczny, od objawów łagodnych po ciężkie z poważnymi komplikacjami [58]. Wiek pacjenta w którym dochodzi do pierwszych objawów niedoborów immunologicznych również jest bardzo zróżnicowany. Zespoły SCID, Wiscotta-Aldricha, Nijmegen czy DiGeorge'a objawiają się już niekiedy po kilku dniach/miesiącach od urodzenia, natomiast inne, np. pospolity zmienny niedobór odporności (CVID – Common Variable Immunodeficiency) mogą się ujawnić w wieku dorosłym pacjenta.

PNO są zaburzeniami heterogennymi, które towarzyszą pacjentowi przez całe życie i nie dają się całkowicie wyleczyć [58, 97]. Wśród pacjentów z niedoborami oprócz ciężkich zakażeń występują również rozmaite schorzenia o podłożu autoimmunologicznym [27, 43, 65]. Niedobory odporności sprzyjają również rozwojowi chorób nowotworowych w obrębie układu chłonnego i najczęściej są to chłoniaki ziarnicze, nieziarnicze czy białaczki [18].

Ogólny podział pierwotnych niedoborów odporności (PNO)

<p>Niedobory związane z dysfunkcją limfocytów B i T:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ciężki T-B-SCID (mutacje w genach RAG-1/2) • Zaburzenia przemiany puryn, niedobór ADA lub PNP • Zaburzenia ekspresji antygenów MHC I/II • Zespół Omenna • Zespół hiper-IgM • Niedobór CD27 	<p>Zaburzenia komórek żernych:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Przewlekła choroba ziarniniakowa • LAD 1/2/3 • Niedobór elastazy (SCN2) • Zespół Kostmanna • Brak receptora dla G-CSF • Brak ziarnistości neutrofilii • Zespół Shwachmana-Diamonda • Zespół Papillon-Lefevre
<p>Dobrze zdefiniowane zaburzenia odporności:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zespół Wiscotta-Aldricha • Zespół Di George'a • Zespół Nijmegen • Zespół Blooma • Zespół Ataksja-Teleangiektazja • Zespół Hiper IgE (HIES) 	<p>Zaburzenia odporności wrodzonej:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Brak receptora dla IL-12 • Brak receptora 1/2 IFN-γ • Brak STAT 1 • Dysplazja Lewandowsky'ego-Lutza (deficyt EVER 1) • Opryszczkowe zapalenie mózgu (HSE), niedobór TLR3
<p>Niedobory przeciwciał:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Niedobór IgG (wszystkich lub określonych podklas) • Niedobór IgA • Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X • Hipogammaglobulinemia z prawidłową liczbą limfocytów B 	<p>Zespoły autozapalne:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zespół Hiper IgD • Zespół Muckle-Wells • Zespół Blaua • Gorączka śródziemnomorska • Deficyt antagonisty receptora dla IL-1 (DIRA) • Cherubinizm
<p>Zaburzenia immunoregulacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zespół Griscelli • Zespół Hermanskiego-Pudlaka • Zespół Chediak-Higashi • IPEX • ALPS • Niedobór ADA2 • APECED (APS-1) • Rodzinna limfohistiocytoza (FHL) 	<p>Niedobory układu dopełniacza:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Niedobór podjednostki C1q, C5, C6, C7, C8, C9 • Niedobór faktora B, D, H • Niedobór properdyny • Niedobór receptora 3 dla dopełniacza (CR3) • Niedobór trombomoduliny • Niedobór białkowego kofaktora błonowego (CD46)

Tabela 3. Klasyfikacja i przykłady pierwotnych niedoborów odporności (PNO) opracowane na podstawie informacji Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych [96].

Oznaczenia: RAG – Recombination Activating Gene; ADA – Adenosine Deaminase; PNP – Purine Nucleoside Phosphorylase; IPEX – Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-Linked syndrome; APECED – Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy; APS-1 – Autoimmune Polyendocrine Syndrome type 1; ALPS – Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome; MHC – Major Histocompatibility Complex; HIES – Hyper-IgE Syndrome; FHL – Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis; LAD - Leukocyte Adhesion Deficiency; SCN - Severe Congenital Neutropenia; G-CSF – Granulocyte Colony Stimulating Factors; IFN – Interferon; STAT – Signal Transducer Activator Transcription; EVER; HSE – Herpes Simplex Encephalitis; TLR – Toll-Like Receptors; DIRA – Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist;

Pierwotne niedobory odporności zostały przez Międzynarodową Unię Towarzystw Immunologicznych (IUIS – International Union of Immunological Societies), podzielone na osiem kategorii (Tabela 3) [17, 73].

Leczenie wdrażane w niedoborach immunologicznych ma na celu łagodzenie objawów, zmniejszenie zachorowalności oraz eliminację powikłań wynikających z nawracających infekcji. Rodzaj terapii jest uzależniony od zdiagnozowanej przyczyny i najczęściej opiera się na antybiotykoterapii, szczepieniach (jeśli pacjent wykazuje zdolność wytwarzania przeciwciał), leczeniu substytucyjnym (w przypadku upośledzenia wytwarzania elementów układu odpornościowego), podawaniu czynników wzrostu (G-CSF – Granulocyte Colony Stimulating Factors) lub na przeszczepianiu szpiku. Często stosowane w postępowaniu terapeutycznym są preparaty suplementacyjne podawane dożylnie (IVIG) lub w postaci iniekcji podskórnej [66, 68, 99, 104]. Szczególnym atutem suplementacji (preparaty immunoglobulinowe) jest zapobieganie występowania zakażeń o różnej etiologii [6, 28]. Skuteczność tej metody została potwierdzona przez zmniejszanie częstości występowania zapaleń płuc, ropnych zapaleń uszu i innych poważnych infekcji bakteryjnych. Suplementacja immunoglobulin ma również ograniczenia, nie chroni przed patogenami wewnątrzkomórkowymi jak mykoplazmy, chlamydie, mykobakterie. Niemniej jednak wszystkie rodzaje stosowanych terapii poprawiają jakość życia i zwiększają przeżywalność pacjentów.

1.2.1. Zakażenia bakteryjne towarzyszące niedoborom immunologicznym

Podstawą w leczeniu chorób zakaźnych jest identyfikacja czynnika etiologicznego. Poznanie przyczyny infekcji jest niezbędne do postawienia właściwej diagnozy i wdrożenia odpowiedniej terapii. Szczególne znaczenie ma to dla osób z dysfunkcjami układu odpornościowego, ponieważ scharakteryzowany czynnik etiologiczny zakażenia może sugerować rodzaj deficytu występującego w organizmie pacjenta. Prawidłowe rozpoznanie rodzaju niedoboru ma kluczowe znaczenie w doborze terapii i skuteczności leczenia.

PNO to duża grupa chorób o zróżnicowanych objawach i przebiegu, jednak wspólną cechą jest występowanie częstych i nawracających zakażeń o ciężkim przebiegu występujących we wszystkich tego typu schorzeniach. Charakterystyczne dla pacjentów z PNO jest także występowanie zakażeń o nietypowej dla zdrowych osób lokalizacji oraz brak wrażliwości na długotrwałą antybiotykoterapię. Najczęściej występującym czynnikiem etiologicznym infekcji u osób z niedoborami odpornościowymi są bakterie. Drobnoustroje te z łatwością mogą przenosić się na różne narządy, a nawet potrafią

wywoływać zakażenia ogólnoustrojowe. Zakażenia następujące po sobie w bardzo krótkich odstępach czasu powodują, że chory nie ma możliwości powrotu do pełnego zdrowia. Charakterystyczne w tej grupie pacjentów jest również występowanie infekcji wywołanych przez drobnoustroje oportunistyczne. Przykłady wybranych patogenów chorobotwórczych występujących u pacjentów z PNO przedstawiono w Tabeli 4 [33, 37, 73, 84, 88, 97, 135].

Skutkiem, występujących u pacjentów z PNO zakażeń bakteriami otoczkowymi, są przewlekłe zapalenie zatok, płuc czy ucha środkowego [5]. Otoczkowe paciorkowce, jak *Streptococcus pneumoniae* czy Gram-ujemne pałeczki *Haemophilus influenzae* są czynnikiem etiologicznym ropnych zakażeń. Wykrywane są zazwyczaj u pacjentów, u których przy prawidłowym poziomie przeciwciał klasy IgM i IgG, występuje niedobór IgA [15], niedobór jednej z podklas IgG, a zwłaszcza niedobór swoistych przeciwciał przeciwko tym patogenom. U pacjentów z niedoborem przeciwciał IgA częściej diagnozuje się zakażenia układu oddechowego niż przewodu pokarmowego, co może wynikać z obecności przeciwciał IgM w błonie śluzowej przewodu pokarmowego [72].

U pacjentów z niedoborami immunologicznymi diagnozowano również bakteryjne infekcje skórne, zapalenie tkanki podskórnej, ropnie i owrzodzenia [98]. Patogenami izolowanymi z takich zmian są również bakterie odpowiedzialne za infekcje występujące w innych miejscach anatomicznych, np. w przewodzie pokarmowym *Helicobacter* i *Campylobacter*. Obraz kliniczny tych zmian skórnych może być zróżnicowany, mogą wystąpić bezobjawowe zapalenia tkanki łącznej, ale również poważne ropnie skórne i owrzodzenia oraz bakteriemie, których zwalczanie wymaga stosowania długotrwałej antybiotykoterapii [25, 39, 118]. Ropnie najczęściej powstają w skórze, węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych takich jak np. wątroba, płuca, mózg i często są nadkażane gronkowcem złocistym (*Staphylococcus aureus*) [54].

Rodzaj niedoboru	Patogen chorobotwórczy		
	Bakterie Gram +/-	Wirusy	Grzyby
Niedobory złożone	<i>Streptococcus, Staphylococcus, Mycobacterium, Listeria, Clostridium, Haemophilus, Moraxella, Neisseria, Pseudomonas, Enterobacteriaceae, Campylobacter, Mycoplasma, Ureaplasma, Chlamydia, Bordetella</i>	Herpeswirusy Adenowirusy Poliomawirusy Papillomawirusy Pokswirusy Parwowirusy Hepadnawirusy Retrowirusy Reowirusy Ortomyksowirusy Paramyksowirusy Rabdowirusy Pikornawirusy Flawiwirusy	<i>Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Histoplasma, Pneumocystis, Scedosporium</i>
Niedobór limfocytów T i B	<i>Listeria, Mycobacterium, Bakterie ropotwórcze, Campylobacter</i>	Wszystkie, zwłaszcza: RSV, EBV, paragrypa typu 3	<i>Candida, Aspergillus</i>
Niedobory z przewagą zaburzenia produkcji przeciwciał	<i>Streptococcus, Staphylococcus, Mycobacterium, Clostridium, Haemophilus, Moraxella, Neisseria, Pseudomonas, Enterobacteriaceae, Campylobacter, Mycoplasma, Ureaplasma, Chlamydia, Bordetella</i>	Herpeswirusy Adenowirusy Poliomawirusy Papillomawirusy Pokswirusy Parwowirusy Retrowirusy Reowirusy Ortomyksowirusy Paramyksowirusy Pikornawirusy	<i>Candida, Pneumocystis</i>
Wrodzone zaburzenia komórek żernych	<i>Staphylococcus, Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas, Enterobacteriaceae, Aerobacter</i>	Herpeswirusy Adenowirusy Poliomawirusy Pokswirusy Parwowirusy Reowirusy Ortomyksowirusy Pikornawirusy	<i>Candida, Aspergillus</i>
Niedobory układu dopęlniacza	<i>Streptococcus, Staphylococcus, Haemophilus, Moraxella, Neisseria, Enterobacteriaceae</i>	Herpeswirusy	–

Tabela 4. Patogeny będące czynnikami etiologicznymi zakażeń występujących u pacjentów z PNO [33, 37, 73, 84, 88, 97, 135].

Zakażenia gronkowcowe są również charakterystyczne w przewlekłej chorobie ziarniniakowej (CGD – Chronic Granulomatous Disease). Na skutek defektu oksydazy NADPH neutrofile (brak generowania wolnych rodników tlenowych), neutrofile przy prawidłowych właściwościach żernych są niezdolne do neutralizacji patogenów. Sprzyja to tworzeniu się charakterystycznych ropni skórnych i narządowych. Ponadto u pacjentów z PNO, oprócz bakteryjnych zakażeń skóry, występują skłonności do rozwoju ziarniniaków (niezakaźne zmiany skórne), które wynikają z powikłań autoimmunologicznych [118].

Upośledzenie odporności może również prowadzić do zapalenia spojówek wywołanych przez *Chlamydia trachomatis* lub częściej *Haemophilus influenzae*. Infekcje te mogą się rozprzestrzeniać i wywoływać groźniejsze w skutkach zapalenia i owrzodzenia rogówki [98]. Wady immunologiczne sprzyjają również rozwojowi zakażeń wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, czy przez pozbawione ściany komórkowej bakterie z gatunku *Mycoplasma pneumoniae*. Zapalenia płuc, w których czynnikiem etiologicznym jest *Mycoplasma pneumoniae* oraz *Pneumocystis jirovecii* (drożdżaki), często towarzyszą chorym z ciężkimi postaciami pierwotnych niedoborów odporności jak SCID czy choroba Burtona (XLA – X-Linked Agammaglobulinemia) [37, 124].

Infekcje drożdżakowe, wywołujące zapalenia płuc lub dolegliwości ze strony układu pokarmowego, są również diagnozowane u chorych z zaburzeniami przełączania klas przeciwciał (CSR – Class Switch Recombination) [87]. Patomechanizm CSR związany z defektem oddziaływania limfocytów B i T ma fundamentalne znaczenie dla powstawania efektorowych komórek plazmatycznych, które uwalniają przeciwciała o wysokim powinowactwie do antygeny [119]. Do prawidłowej aktywacji CSR i rozwoju limfocytów B niezbędne jest oddziaływanie receptora CD40 z ligandem CD40 (CD40L, CD154) na aktywowanych limfocytach T CD4+.

Wspomniane wcześniej zakażenia wywołane Gram-ujemnymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*, są również często diagnozowane u pacjentów z niedoborami odporności. Należące do tej rodziny pałeczki jelitowe *Shigella flexneri* i *Shigella sonnei* są odpowiedzialne zazwyczaj za czerwonkę bakteryjną oraz za zapalenie okrężnicy [103]. W krajach rozwiniętych są to zwykle pojedyncze przypadki zachorowań, natomiast w krajach o niskim poziomie życia sanitarnego stanowią problem o charakterze epidemicznym [19]. Zakażenia te u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym mogą ustąpić samoistnie, natomiast u pacjentów z PNO wymagają długotrwałej antybiotykoterapii.

Przebieg zakażenia pałeczkami z rodzaju *Shigella* jest bardziej nasilony u pacjentów z niedoborami (ciężkie zapalenia błon śluzowych jelit i odbytu, krwawe i ropne biegunki), co wymaga zwiększonej opieki nad chorymi [87]. Zakażenia pałeczkami z rodzaju *Shigella* mogą rozprzestrzeniać się i powodować ostre zapalenia opon mózgowych o charakterze nawracającym mimo stosowania celowanej antybiotykoterapii. Współistniejące u takich pacjentów infekcje wywołane przez *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Streptococcus pneumoniae*, sugerują dysfunkcje układu odpornościowego [19]. Przyczyną tych zakażeń są upośledzenia odporności wrodzonej, które wynikają z niewłaściwego funkcjonowania receptora interleukiny 1 (IL-1) sprzężonego z kinazą-4 (IRAK-4), który jest mediatorem transdukcji sygnału receptora Toll-podobnego (TLR – Toll-like receptor) i nadrodziny receptora interleukiny 1 (IL-1R) [59]. Nietypowa sytuacja występuje u dzieci i niemowląt z agammaglobulinemią spowodowaną dziedzicznymi z chromosomem X mutacjami genetycznymi (XLA). Objawia się to zaburzeniami produkcji lub dysfunkcją działania wszystkich klas i podklas przeciwciał. Zakażenia u niemowląt z takimi dysfunkcjami mogą nie wystąpić, zanikać samoistnie lub ustąpić po podaniu antybiotyku, co znacznie utrudnia wykrycie niedoboru. Dzieje się tak za sprawą przeciwciał przekazywanych dziecku od matki przez łożysko, które utrzymują się przez ok. 4 miesiące życia [90, 124].

U pacjentów z prawidłowo funkcjonującą odpornością komórkową (limfocyty T, komórki NK) i występowaniem niedoboru swoistych przeciwciał, często wykrywa się zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych wywołane obecnością bakterii otoczkowych jak *Streptococcus pneumoniae* czy *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenza* i *Staphylococcus aureus* oraz niektóre gatunki z rodzajów *Pseudomonas* i *Mycoplasma* również wywołujące infekcje dróg oddechowych w tej grupie pacjentów. Jednak te infekcje mogą się przeobrażać w przewlekłe choroby oskrzeli i płuc (w tym rozstrzenie oskrzeli czy zwłóknienia płuc). Późne rozpoznanie może prowadzić do znacznego upośledzenia zdrowia, uszkodzenia narządów, a nawet śmierci [37].

W przypadku chorych z ciężkimi niedoborami jak XLA czy CVID wykrywa się zakażenia o nietypowej lokalizacji. *Ureaplasma urealyticum*, u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, może być odpowiedzialna za infekcje układu moczowo-płciowego. Podczas gdy u pacjentów z PNO, gatunek *U. urealyticum* może ponadto powodować infekcje układu oddechowego [26]. W tych podtypach niedoborów diagnozuje się również infekcje wywołane niegruźliczymi prątkami *Mycobacterium hominis*

i *Mycobacterium avium*, odpowiedzialne za zapalenie płuc, węzłów chłonnych, skóry i tkanki podskórnej oraz zapalenie otrzewnej [10].

Bakterie jak *Mycoplasma* (*M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. felis*, *M. orale*, *M. salivarium*) i *Ureaplasma* (*U. urealyticum*) wywołujące zazwyczaj infekcje układu moczowego, u pacjentów z PNO są dodatkowo odpowiedzialne nie tylko za zakażenia układu oddechowego, ale również za zapalenia stawów [11, 92, 113]. Zwykle zakażenie obejmuje pojedyncze stawy (kolanowy, łokciowy, biodrowy czy barkowy), ale niekiedy może obejmować kilka stawów symetrycznie, które leczy się tetracykliną z jednoczesną suplementacją przeciwciał [36, 38].

Pacjenci z wadami układu odpornościowego wykazują również zwiększoną skłonność do infekcji żołądkowo-jelitowych i wątroby, które charakteryzują się nieprzyjemnymi i niebezpiecznymi dla zdrowia i życia objawami, tj. problemami z wchłanianiem składników pokarmowych, biegunkami, odwodnieniem i utratą masy ciała [133]. Wśród pacjentów ze schorzeniami z grupy PNO odnotowuje się również częste zapalenia okrężnicy, w których czynnikiem etiologicznym są bakterie z rodzaju *Campylobacter*, *Clostridium* czy *Salmonella* [124]. Pacjenci, którzy dodatkowo cierpią na neutropenię (niedobór neutrofilii) są bardziej podatni na wiele infekcji jak zapalenie błon śluzowych czy uogólnione zakażenie pomimo wdrożonej antybiotykoterapii. Chorzy z przewlekłą chorobą ziarniniakową (dysfunkcja fagocytów), niedoborem mieloperoksydazy MPO (MPO – Myeloperoxidase Deficiency) są podatni na trudne do leczenia zakażenia układu oddechowego, ropnie skórne i narządowe wywołane zakażeniem gronkowcem *Staphylococcus aureus*. Często od tych pacjentów izoluje się również wiele bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, jak pałeczki *Klebsiella* czy fakultatywne beztlenowce jak *Aerobacter* [53].

Osoby, u których zdiagnozowano zespół hiper-IgE (HIES – Hiper-IgE Syndrome), zwanym również zespołem Hioba, wykazują trzy podstawowe postacie tego zespołu. Postać autosomalna dominująca, (AD-HIES) z upośledzeniem funkcjonowania cząsteczki sygnałowej STAT3 (chromosom 17q21) i dwie postacie recesywne (AR-HIES). Szczególnie niebezpieczne, u osób z tym zespołem, są nawracające zapalenia płuc z nasilonym odczynem zapalnym, w których czynnikiem etiologicznym mogą być bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* oraz *Streptococcus pneumoniae* [15]. U pacjentów z zespołem Hioba pojawiają się również tzw. zimne ropnie skórne (ropień jałowy) i wypryski skórne.

Do najgroźniejszych zakażeń bakteryjnych, zagrażających pacjentom z niedoborami odporności, należą zakażenia ogólnoustrojowe. Sepsa nie jest samodzielną jednostką chorobową, definiuje się ją jako zagrażającą życiu dysfunkcję narządową spowodowaną zaburzoną regulacją odpowiedzi organizmu na zakażenie. Infekcje tego typu najczęściej rozwijają się z zakażeń krwiopochodnych. Mogą towarzyszyć wszystkim rodzajom PNO, ale najczęściej pojawiają się przy nieleczonej neutropenii, niedoborze lub braku przeciwciał jak XLA czy CVID [37]. U osób z zaburzeniami typu XLA i CVID czynnikami etiologicznymi posocznicy są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, Gram-dodatnie paciorkowce *Streptococcus pneumoniae* i Gram-ujemne pałeczki *Haemophilus influenzae*. Bakterie z gatunku *H. influenzae* mogą również odpowiedzialne za zapalenia opon mózgowych [6, 28]. Ciężkie zakażenia, jak bakteryjne zapalenie stawów, zapalenia kości i szpiku kostnego czy zapalenia opon mózgowych, towarzyszą również niedoborom występującym najrzadziej jako deficyty białek dopełniacza od C5 do C9. Za te schorzenia zazwyczaj odpowiedzialne są bakterie z gatunku *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i względny beztlenowiec *Listeria monocytogenes* [28, 124]. W złożonych przypadkach niedoborów odporności charakterystyczne mogą być ropnie skórne, zapalenia kości, płuc i mózgu, a czasami zakażenia ogólne, wywołane prątkami szczepionkowymi BCG (BCG – Bacillus Calmette-Guérin) [97].

1.2.2 Infekcje wirusowe towarzyszące pierwotnym niedoborom odporności

W walce organizmu z infekcją wirusową najistotniejsza jest odporność komórkowa, w której biorą udział limfocyty CD4+, CD8+, komórki NK oraz uwalniane przez nie cytokiny jak interferon typu I, TNF- α . Z uwagi na fakt, że te prozapalne cząstki biorą udział w eliminacji wirusów oraz zakażonych nimi komórek, ich dysfunkcje będą prowadzić do dynamicznego rozwoju zakażenia o etiologii herpeswirusowej (CMV, EBV), paramyksowirusowej (RSV) i ortomyksowirusowej (grypa). Dzieje się tak w najcięższych przypadkach pierwotnych niedoborów odporności, jak SCID [88]. Istotne w tym procesie są również specyficzne receptory znajdujące się na powierzchni komórek układu odpornościowego TLR, TIM (TIM – T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain), TAM (TYRO3, AXL, MER), CLR (CLR – C-type lectin receptors) RLR (RLR – RIG-I-Like Receptors) oraz białka NODD-LRR.

Mutacje w obrębie genów, kodujących wyżej wymienione receptory, będą związane z uogólnionym zakażeniem o ciężkim przebiegu. Receptory te znajdują się wewnątrz wszystkich komórek organizmu, z wyjątkiem TLR, który występuje głównie

wewnątrz komórek dendrytycznych. Receptory TLR przez aktywację swoistych antygenowo limfocytów T i B stymulują odporność wrodzoną. Oddziaływania między tymi receptorami a wirusami, prowadzą do aktywacji kaskady zdarzeń odpowiedzialnych za produkcję interferonu. Interferony należą do grupy cytokin (glikoprotein), a ich głównym zadaniem jest ingerencja w proces replikacji wirusów wewnątrz komórek gospodarza. Ponadto aktywują komórki układu odpornościowego (komórki NK i makrofagi), pomagają w rozpoznaniu infekcji dzięki regulacji prezentacji antygenów limfocytom T, wzmacniają odporność zdrowych komórek na infekcje wirusowe oraz hamują namnażanie się wirusów przez hamowanie syntezy ich białek. Wytwarzanie interferonu typu 1 wymaga udziału trzech białek, homolog białka UNC-93, TLR3 i TRAF3, (wchodzących w szlak sygnałowy TLR), których mutacje zakłócają szlak sygnałowy prowadzący do produkcji IFN-1. Autosomalne recesywne mutacje homologa B1 białka UNC-93 zakłócają szlak sygnałowy TLR, co utrudnia uwalnianie TLR z retikulum endoplazmatycznego (ER) do endosomu. Efektem tego jest zwiększenie predyspozycji do zachorowania na opryszczkowe zapalenie mózgu (HSE – Herpes Simplex Encephalitis) [101, 102]. HSE u dzieci z tą mutacją ustępowało po leczeniu acyklowirem, lecz zakażenie nawracało.

Podobnie dzieje się u pacjentów z agammaglobulinemią, u których rozwija się zapalenie mózgu o etiologii echowirusowej. Zapalenie mózgu wywołane przez wirusy ECHO (Enteric Cytopathogenic Human Orphan Viruses) daje zróżnicowane objawy, od łagodnych przypominających przeziębienie, do nasilonych z bólem głowy, wysoką gorączką, utratą słuchu, ataksją, parestezją, napadami drgawek, zmianami w zachowaniu czy spadku umiejętności poznawczych [92]. Autosomalna, heterozygotyczna, dominująca mutacja receptora TLR3 sprzyja rozwojowi HSE przez zahamowanie jego aktywności. Przypuszcza się jednak, że skutki tej mutacji nie są jednoznaczne, ponieważ obraz kliniczny pacjentów z tą mutacją jest zróżnicowany. Mutacja czynnika 3 związanego z receptorem TNF (TRAF3), biorącego udział w szlaku sygnałowym prowadzącym do wytwarzania interferonu, także może predysponować pacjentów do nawracającego opryszczkowego zapalenia mózgu. U dzieci z mutacjami w obrębie tych białek, nie stwierdzono ciężkich przypadków zakażeń innymi wirusami. U większości dzieci zapadających na HSE nie potwierdza się jednak przyczyny genetycznej. W leczeniu dzieci z opryszczkowym zapaleniem mózgu stosuje się acyklowir lub IFN- α [46, 67].

Pacjenci cierpiący na niedobór lub brak przeciwciał (XLA, ARA) są szczególnie podatni na zakażenia wirusowe [21]. Nie oznacza to jednak, że osoby zdrowe nie zapadają na infekcje wywołane wirusami np. z rodziny *Herpesviridae* jak HSV-1/2, CMV, EBV,

VZV, tylko że wady w wytwarzaniu przeciwciał szczególnie predysponują do wystąpienia infekcji (Tabela 4). Wirusowe zapalenie wątroby typu C u osób zdrowych przebiega podobnie jak u pacjentów z niedoborami, lecz u tych drugich przebieg choroby jest bardziej gwałtowny, w szczególności u dzieci, u których nie zdiagnozowano jeszcze niedoborów [104]. Różnice objawów u osób zdrowych i u pacjentów z niedoborami mogą sugerować wady układu immunologicznego, jednak nie są one na tyle silne, aby na ich podstawie zdiagnozować niedobór odporności [33, 88].

Przebieg zakażeń wirusowych u pacjentów z PNO jest zależny od typu niedoboru. Niedobór przeciwciał sprzyja rozwojowi szczególnie niebezpiecznych zakażeń jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, z których może rozwinąć się posocznica. Do równie niebezpiecznych infekcji zalicza się zakażenia wywołane wirusem *Coxsackie*, poliovirusem i echowirusem, które wywołują zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i martwicze zapalenie powięzi [42].

Zakażenia o etiologii enterowirusowej również stanowią problem wśród pacjentów z PNO. W terapii stosuje się suplementację przeciwciał, lecz pomimo prawidłowego poziomu immunoglobulin G, znane są przypadki rozwoju infekcji w zapalenie mózgu [80, 100]. Powodem tego może być rozpoczęcie suplementacji po stwierdzonej infekcji lub zachorowanie poszczepienne, które wystąpiło wiele lat po przyjęciu szczepionki przeciw poliovirusowi [31, 69]. W diagnostyce zakażeń enterowirusowych, wśród pacjentów z niedoborami, bierze się pod uwagę podwyższony poziom limfocytów i białek w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz obniżony poziom glukozy. Jednak ze względu na to, że w niektórych przypadkach oznaczony poziom białek i glukozy pozostaje w normie, to do postawienia diagnozy niezbędne są dodatkowe badania. Badania tomograficzne i obrazowanie rezonansem magnetycznym w początkowym stadium infekcji nie ukazują zmian w mózgu, w późniejszych stadiach dochodzi do zmniejszenia istoty szarej i białej.

Dożylne podawanie preparatów krwiopochodnych, w tym immunoglobulinowych, u pacjentów z PNO wiązało się z ryzykiem zakażenia innymi wirusami jak WZW C. Należy jednak podkreślić, że ulepszenie metod pozyskiwania tych preparatów wyeliminowało ten problem i od tego czasu nie odnotowano przypadków zakażeń wynikających z dożylnego podawania preparatów na bazie przeciwciał [101].

1.3. Suplementacja immunoglobulin u pacjentów z niedoborami odporności

W leczeniu chorób wywołanych infekcjami bakteryjnymi coraz większy problem stanowi antybiotykooporność. Wśród pacjentów z niedoborami odporności, u których występuje wadliwe działanie układu immunologicznego, stanowi to znacznie poważniejszy problem. Problem ten dotyczy nie tylko zakażeń pałeczkami *Shigella*, które nabierają oporności na trimetoprim i sulfametoksazol stosowane w tradycyjnym leczeniu, ale również dotyczy opornych na wankomycynę enterokoków. Wielooporne gatunki bakterii jak *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, są częstymi czynnikami wywołującymi m. in. szpitalne zapalenia płuc. Ze względu na oporność bakterii na antybiotyki opracowuje się alternatywne metody leczenia zakażeń, jak konstruowanie terapeutyków suplementacyjnych, które u osób z wadami układu odpornościowego, jak niedobory przeciwciał, są szczególnie uzasadnione. Kolejną zaletą terapii suplementacyjnej jest małe prawdopodobieństwo zaistnienia oporności krzyżowej ze względu na inny mechanizm działania antybiotyków i przeciwciał. Ochronne działanie przeciwciał antybakteryjnych opiera się na dwóch podstawowych mechanizmach: oddziaływaniu bezpośrednio z powierzchnią bakterii oraz wiązaniu i neutralizowaniu toksyn bakteryjnych lub innych czynników zjadliwości [7].

1.3.1. Bezpośrednia neutralizacja patogenów przeciwciałami

Antygeny znajdujące się na powierzchni komórek bakteryjnych są łatwo dostępne dla przeciwciał, które po przyłączeniu się uniemożliwiają bakteriom kolonizację oraz ułatwiają fagocytozę komórkom żernym (opsonizacja). Niektóre przeciwciała, jak jednołańcuchowe przeciwciała skierowane przeciw krętkowi *Borellia*, wykazują bezpośrednią zdolność do zabijania patogenu [63]. Również przeciwciała antyidiotopowe naśladujące toksynę drożdży wykazują bezpośrednią zdolność do zabijania w szerokim zakresie Gram-dodatnich bakterii oraz grzybów i mikobakterii [22]. Suplementowanie takich przeciwciał potencjalnie może przewyższyć skuteczność przeciwciał gospodarza w walce z patogenami. Przeciwciała z odpowiednimi izotypami regionu stałego (głównie ludzkie IgG1 i IgG3) mogą angażować komórki układu odpornościowego o działaniu stymulującym fagocytozę bakterii przez makrofagi, indukowanie cytotoksyczności komórkowej (makrofagi, komórki NK) zależnej od przeciwciał (ADCC – Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) i aktywacji kaskady dopełniacza. Przeciwciała klasy IgM również mogą aktywować działanie dopełniacza i ADCC. Ponadto zmienne regiony

przeciwiała są zdolne do katalizowania reakcji redoks z dostarczonego tlenu singletowego przez aktywowane neutrofile, co prowadzi do powstania bardzo silnych utleniaczy o bezpośrednim działaniu bakteriobójczym (w tym ozonu o silnym działaniu przeciwbakteryjnym, dodatkowo stymulującym reakcje zapalne) [4, 123]. Stan zapalny wywołany aktywacją dopełniacza oraz wytwarzanie ozonu sprzyja angażowaniu dodatkowych elementów układu odpornościowego, co prowadzi do zwiększenia odporności.

1.3.2. Neutralizacja pośrednia

Bakterie wytwarzają szereg czynników zjadliwości takich jak proteazy i toksyny, a także cząstki sygnalizacyjne. Neutralizacja czynników zjadliwości jest pośrednim sposobem działania układu odpornościowego w procesie zwalczania infekcji. Obecnie wiadomo, że bakterie wytwarzają czynniki regulujące aktywność metaboliczną innych bakterii w ich sąsiedztwie. Ta wewnątrz lub międzygatunkowa „komunikacja” jest nazywana *quorum sensing*.

Bakterie Gram-ujemne komunikują się za pomocą autoinduktorów (AI – Autoinducer), takich jak acylowane laktony homoseryny i homocysteiny [75]. Ekspresja autoinduktorów reguluje ekspresję czynników zjadliwości przyczyniających się bezpośrednio do kolonizacji i rozpowszechniania się patogenu. Wykazano również, że acylowany lakton homoseryny zakłóca sygnalizację komórek odpornościowych gospodarza i może indukować apoptozę makrofagów [60]. W badaniach na modelu zwierzęcym, wykazano że myszy po immunizacji acylowanym laktonem serynowym były odporne na zakażenia bakteriami z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*. Przeciwciała wytworzone po immunizacji dodatkowo chroniły makrofagi przed apoptozą wywołaną acylowanym laktonem serynowym [55, 79].

Sygnalizacja wśród bakterii Gram-dodatnich odbywa się głównie przez krótkie peptydy. Wykazano, że monoklonalne przeciwciało przeciwko autoindukowanemu peptydowi 4 (API-4 – Autoinducing Peptide 4) ze *Staphylococcus aureus* chroniło myszy przed rozwojem infekcji tym patogenem [94]. Zarówno badania *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że neutralizowanie cząsteczek (autoinduktory) produkowanych w procesie *quorum sensing*, może stanowić skuteczną metodę leczenia zakażeń bakteryjnych.

1.4. Rodzina *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae to rodzina Gram-ujemnych, względnie beztlenowych, bakterii bytujących w przewodach pokarmowych ludzi i zwierząt. Są krótkimi pałeczkami

z zaokrąglonymi końcami, mają od 0,5 do 1,5 μm szerokości i ok 24 μm długości. Wiele z nich posiada perytrychalne urządzenie, gatunki z licznymi rzęskami (np. *Proteus* spp.) wykazują ruchliwość na powierzchni agaru, tzw. pełzanie. Niektóre bakterie z tej rodziny posiadają otoczkę. Wszystkie (z wyjątkiem *Klebsiella granulomatis*) rosną na prostych podłożach, są odporne na wiele związków chemicznych, toksycznych dla bakterii z innych rodzin, co jest wykorzystywane w podłożach wybiórczych.

W skład rodziny *Enterobacteriaceae* wchodzi zarówno bakterie chorobotwórcze, jak i oportunistyczne (Tabela 5).

<i>Enterobacteriaceae</i>	
Patogeny bezwzględne	Patogeny oportunistyczne
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Enterobacter</i>
	<i>Morganella</i>
	<i>Providencia</i>
	<i>Citrobacter</i>
	<i>Hafnia</i>

Tabela 5. Najważniejsze bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*

1.4.1. Patogenność *Enterobacteriaceae*

Patogenność, to zdolność drobnoustroju chorobotwórczego do wywołania stanu chorobowego w organizmie gospodarza. Warunkiem wystąpienia choroby jest wrażliwość gospodarza i chorobotwórczość patogenu. Patogenność określana jest przez wirulencję (zjadliwość), czyli zdolność drobnoustroju do wywołania poważnej choroby. Mikroorganizmy oraz wirusy mogą charakteryzować się patogennością (wywoływać stany chorobowe) i niską wirulencją (łagodny przebieg choroby). Patogenność jest warunkowana przez wiele cech genetycznych i biochemicznych, które przejawiają się między innymi

inwazyjnością, zdolnością do produkcji toksyn (endo, egzo i cytotoxyn), czynnikami adhezji, opornością na dopełniacz i fagocytozę oraz gromadzeniem dwuwartościowych jonów żelaza. Inwazyjność, to zdolność patogenów do wnikania do komórek i zasiedlania tkanek gospodarza.

W toku ewolucji bakterie wykształciły wiele mechanizmów umożliwiających kolonizację, np. u pałeczek *Shigella* zdolność tę warunkują kodowane plazmidowo i chromosomalnie białka takie jak: IpaA, Spa, Mxi czy Vir. Podczas gdy u *Salmonella* rolę tę pełni białko InvA, a u *Yersinia* białko LcrD. Inwazyjność bakterii warunkuje również ich zdolność do przewyciężenia działania mechanizmów obronnych gospodarza. Namnażanie się patogenu wewnątrz organizmu gospodarza oraz towarzysząca mu produkcja toksyn często doprowadza do zniszczenia jego komórek.

Bakterie za pomocą białek błonowych wiążą się do receptorów na powierzchni komórek gospodarza, co umożliwia internalizację bakterii do komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego. Niektóre bakterie wiążą się z receptorami przez białka mediacyjne lub omijając etap adhezji i wykorzystując mechanizmy komórkowe, wnikają do komórki w procesie pinocytozy. Enteropatogeny wykorzystują dwa mechanizmy wnikania: mechanizm zamka (zipper mechanism) np. *Yersinia* oraz mechanizm spustu (trigger mechanism) np. *Shigella* i *Salmonella*. Mechanizm spustu opiera się na znaczącym przegrupowaniu cytoszkieletu nazywanym marszczeniem błony (membrane ruffles), natomiast mechanizm zamka po związaniu bakterii do komórki gospodarza, powoduje niewielkie zmiany w białkach cytoszkieletu, które są inicjowane przez swoiste oddziaływanie między ligandem bakteryjnym (inwazyją), a receptorami powierzchniowymi komórek gospodarza. Ważną różnicą między mechanizmami spustu i zamka jest to, że ten pierwszy jest inicjowany od „wewnątrz” poprzez działanie efektorów bakteryjnych dostarczanych przez systemy wydzielnicze, a ten drugi jest inicjowany z „zewnątrz” przez aktywację receptorów komórek gospodarza.

Do klinicznie ważnych rodzajów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, należą przedstawiciele: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Połowa wszystkich przypadków sepsy w Stanach Zjednoczonych wywołwana jest przez bakterie z rodzaju *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* i *Proteus*, a śmiertelność dochodzi nawet do 50%. Wiele szczepów należących do tej rodziny pałeczek jelitowych wywołuje zakażenia szpitalne oraz infekcje u pacjentów z niedoborami odporności (AIDS, PID).

Zakażenia pałeczkami *Shigella* stanowią największy problem w krajach rozwijających się. Z powodu trudnych warunków sanitarnych oraz katastrof naturalnych jak trzęsienia ziemi, tsunami czy powódzie, pojedyncze zakażenia z łatwością przekształcają się w epidemie. Skutkiem wniknięcia pałeczek *Shigella* do komórek nabłonkowych oraz ich zasiedlenia śluzówki okrężnicy, jest degradacja nabłonka i zapalenie błony podstawnej. Komórki nabłonka obumierają, złuszcza się, dochodzi do nadprodukcji śluzu, owrzodzenia śluzówki, a następnie do krwawienia. Powoduje to występowanie wodnistych, krwawych i/lub śluzowych biegunek oraz zniszczenie bariery światła jelita/krew [24]. Bakterie z rodzaju *Shigella* są jednymi z najczęstszych przyczyn biegunek (o przebiegu od umiarkowanego do ciężkiego) na świecie. Do wywołania infekcji wystarczy poniżej 100 komórek bakteryjnych, które nie ulegają zniszczeniu w kwaśnej treści żołądka. Powodują około 80 mln – 165 mln przypadków rocznie z czego 74 tys. – 600 tys. to przypadki zakażeń śmiertelnych [57, 74, 107].

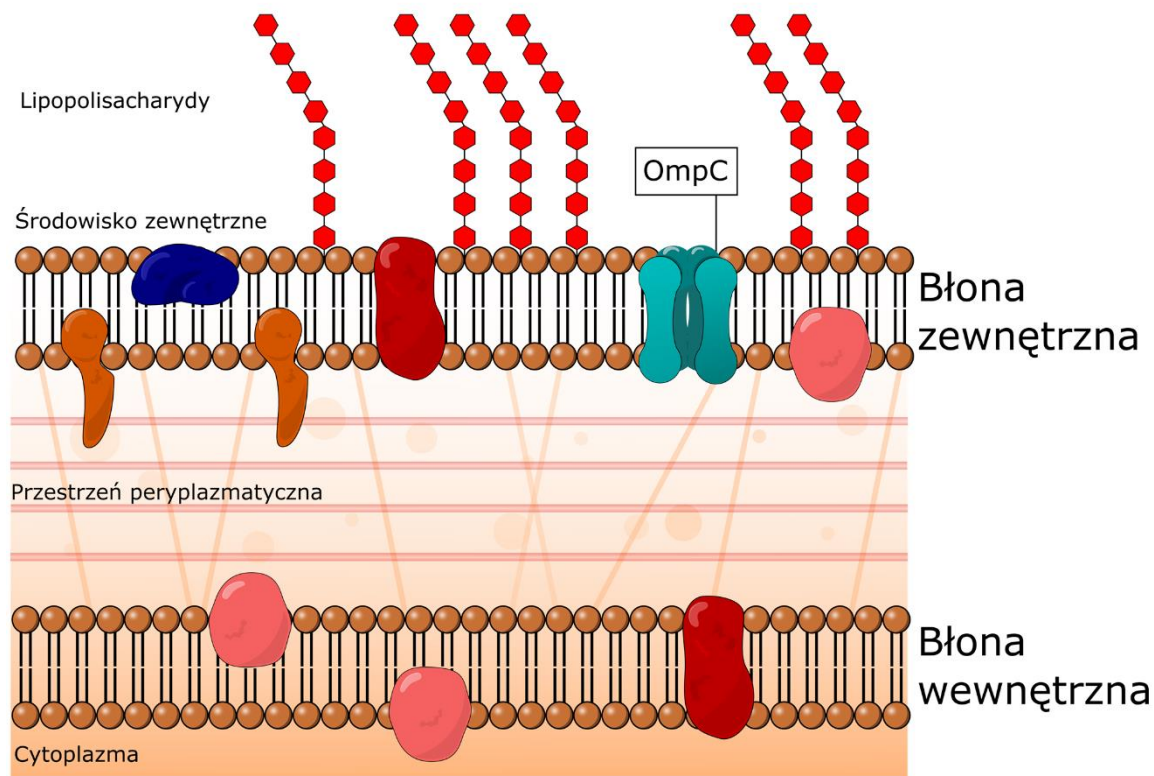
Zakażenia najczęściej występują u osób starszych oraz u dzieci do 5 r.ż. W tej grupie wiekowej występuje największa śmiertelność. Wśród bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* notowany jest wzrost liczby szczepów opornych na antybiotyki [76].

Zdarza się, że między strukturami występującymi na powierzchni komórek bakterii i komórek gospodarza, występuje podobieństwo i zjawisko to nazywane jest mimikrą molekularną [71]. Często jest to główna przyczyna opóźnienia działania układu odpornościowego, która może sprawiać, że nawet łagodny przebieg infekcji doprowadzi do wytworzenia autoprzeciwciał i rozwoju choroby autoimmunologicznej. Do rozwoju takiej choroby dochodzi, gdy we krwi zbyt długo pozostaje kompleks antygen-przeciwciało, co przez układ odpornościowy zostaje rozpoznane jako obce. Najczęściej opisywane choroby autoimmunizacyjne w kontekście zakażeń bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* są choroba Gravesa-Basedowa, reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) czy zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) [58].

1.4.2. Budowa osłony komórkowej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*

Ściana komórkowa bakterii, to wielofunkcyjna struktura, która nadaje charakterystyczny kształt tym drobnoustrojom, chroni je przed czynnikami zewnętrznymi (w tym przed układem odpornościowym człowieka) oraz stanowi podstawę ważnych elementów powierzchniowych jak białka, fimbrie i rzęski. Ściana komórkowa Gram-ujemnych bakterii jest wytrzymała na wysokie ciśnienie otoczenia oraz odporna na ekstremalne wartości temperatury i pH. Ich osłona komórkowa zbudowana jest z dwóch lipidowych dwuwarstwowych błon, które oddzielone są przestrzenią peryplazmatyczną z 2–3 warstwami

peptydoglikanu. Błona wewnętrzna (cytoplazmatyczna) zawiera w swojej strukturze liczne białka powierzchniowe i przezłonowe. Błona zewnętrzna oprócz białek i lipoprotein zawiera również lipopolisacharyd (LPS) (Rycina 1).



Rycina 1. Budowa osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych.

Ściana komórkowa (CW – Cell Wall) zbudowana jest z błony zewnętrznej (OM – outer membrane), peryplazmy i peptydoglikanu i wraz z błoną wewnętrzną (IM – inter membrane) tworzy osłonę komórkową bakterii. Zewnętrzna błona komórkowa, w przeciwieństwie do błony wewnętrznej jest półprzepuszczalna. Odpowiednie mechanizmy komórkowe zapewniają selektywny transport substancji w obu kierunkach. Substancje odżywcze transportowane są do wnętrza komórki, natomiast szkodliwe produkty metaboliczne są z niej usuwane. Błona zewnętrzna oddziela wewnętrzne elementy osłony komórkowej od środowiska zewnętrznego. W swojej strukturze zawiera liczne białka (stanowiące ok 50% jej masy), fosfolipidy i LPS. Białka i LPS wyeksponowane na powierzchni komórki bakteryjnej są ważnymi czynnikami oporności bakterii, ale odgrywają również ważną rolę w stymulacji i odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. Białka mogą być związane z błoną oraz wydzielane na zewnątrz bakterii. Niektóre z nich połączone są z innymi cząstkami tworząc

np. lipoproteiny, które wiążąc się z peptydoglikanem stabilizują ścianę komórkową (lipoproteina Brauna).

1.4.3. Białka błony zewnętrznej

Błona wewnętrzna zbudowana jest z podwójnej warstwy fosfolipidowej w której skład wchodzi fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloglicerol i kardiolipina oraz inne hydrofobowe cząsteczki jak sterole, glikolipidy i lipidy zawierające reszty aminokwasów. Stosunek poszczególnych składników jest uzależniony od gatunku i szczepu bakterii oraz od warunków w jakich żyje. W białkach błony wewnętrznej dominuje struktura α -helis, natomiast w białkach błony zewnętrznej przeważają β -baryłki. Białka błony wewnętrznej zakotwiczone przez pojedyncze lub wielokrotne przezbłonowe α -helisy są znacznie bardziej hydrofobowe niż występujące w białkach błony zewnętrznej β -baryłki. Błona zewnętrzna, ze względu na pełnione funkcje związane z utrzymaniem odpowiedniego ciśnienia osmotycznego czy ochroną przed wnikaniem szkodliwych substancji, jest sztywną strukturą o selektywnej przepuszczalności. Duże znaczenie mają również białka błony zewnętrznej zwane porynami. Są one odpowiedzialne za czynny i bierny transport różnych substancji przez błonę w obu kierunkach. Mogą działać niespecyficznie jak sita molekularne umożliwiając transport małych cząsteczek lub jako wyspecjalizowane kanały transportujące cząsteczki o większej masie [117].

1.4.4. Biosynteza białek błony zewnętrznej

Biosynteza białek błony zewnętrznej przebiega w cytoplazmie. Do ich przemieszczenia konieczna jest sekwencja sygnałowa, która następnie jest odcinana przez peptydazę sygnałową, a białka uwalniane są do peryplazmy, gdzie następuje ich pofałdowanie przed wbudowaniem w błonę zewnętrzną. Białka błony zewnętrznej (OMP) transportowane są przez translokazę Sec (lub translokazy SecYEG) tylko w formie niesfałdowanej. Proces ten wymaga energii z rozpadu ATP. Utrzymanie OMP w formie niesfałdowanej jest możliwe dzięki białku opiekuńczemu (chaperone protein) SecB. Niektóre z białek błony zewnętrznej mają na C-końcu znacznik zbudowany z kilku aromatycznych i hydrofobowych aminokwasów, który ułatwia im wbudowanie się w błonę. W zapobieganiu agregacji białka w środowisku hydrofilowym zaangażowane są liczne białka opiekuńcze np. SurA, Skp i pełniące podwójną funkcję chaperonu i proteazy DegP [14, 61]. Białko SurA odpowiedzialne za wydajne składanie OMPs, działa wspólnie z niezbędnym do gromadzenia LPSu czynnikiem LptD, preferującym ten szlak składania

białek błony zewnętrznej. Po przejściu przez peryplazmę rozfałdowane OMP dociera do przezbłonowego kompleksu Bam. Centralną częścią tego kompleksu jest BamA będące fragmentem transmembranowym. W jednej z domen tego białka występuje przedłużona N-końcowa sekwencja wnikająca do peryplazmy. Zbudowana jest z pięciu domen POTRA (POTRA – Polypeptide Translocation Associated) oznaczonych P1 – P5. P1 jest domeną alternatywną, natomiast domeny P2–P5 oddziałują z BamB. Domena P5 dodatkowo zapobiega oddziaływaniom między BamA i BamC/D/E [105]. Dokładne funkcje tych domen nie zostały jeszcze dobrze opisane, ale brak którejkolwiek z nich skutkuje wadami w funkcjonowaniu OMP. O procesie biosyntezy, fałdowaniu oraz wbudowywaniu w błonę białek OMP wiadomo już bardzo dużo, ale dokładne poznanie tych procesów wymaga dalszych badań [105].

1.4.5. Budowa i funkcje białek błony zewnętrznej

Białka błony zewnętrznej (OMPs), oprócz wielu funkcji fizjologicznych i sygnałowych, stabilizują strukturę błony. Jednym z najważniejszych zadań tych białek jest transport składników odżywczych, witamin, hormonów i innych niezbędnych do funkcjonowania składników do wnętrza komórki oraz wydalanie z komórki szkodliwych metabolitów [110].

Synteza białek błony zewnętrznej odbywa się w cytoplazmie, a zawarta w nich sekwencja sygnałowa umożliwia ich dalszy transport. Po translokacji do peryplazmy sekwencja sygnałowa zostaje odcięta, białka ulegają fałdowaniu, a następnie są wbudowywane w błonę. W przezbłonowych białkach błony wewnętrznej (IM) dominują struktury α -helis, natomiast w błonie zewnętrznej (OM) struktury β -baryłek. Harmonijka beta to jedna ze struktur drugorzędowych białka. Jest to sposób ułożenia przestrzennego łańcuchów zbudowanych z aminokwasów, który jest stabilizowany przez wiązania wodorowe. Wiązania te tworzą się pomiędzy aminokwasami w sąsiednich łańcuchach, które zazwyczaj zawierają 5–10 aminokwasów. β -baryłki mogą przyjmować ułożenie równoległe, antyrównoległe bądź mieszane. Jeśli nici tworzące baryłkę (z jednego łańcucha aminokwasów) leżą bezpośrednio obok siebie, to pętla zwrotu nazywana jest zakrętem beta (Rycina 2).



Rycina 2. Fragment poryny bakteryjnej zawierającej antyrównoległe β -zwoje oraz zakręty β .

Budowę struktur beta określa się za pomocą liczby β -nici oraz liczby S (shear numer) Liczba S określa kąt nachylenia nici β względem osi pionowej poryny, co również charakteryzuje oddziaływania między nimi. Sąsiadujące nici tworzące antyrównoległą β -harmonijkę tworzą stabilną cylindryczną strukturę.

Białka błony zewnętrznej są wielofunkcyjne i ze względu na pełnione różne funkcje możemy podzielić je na 8 grup [129]:

- 1) Poryny: OmpF, OmpC, PhoE, OmpA, LamB, ScrY, FadL
- 2) Białka aktywnego transportu: FepA, FecA, FhuA, BtuB
- 3) Białka o właściwościach enzymatycznych: OMPLA, OmpT, PgtE, PagP
- 4) Białka wirulencji: adhezyny, inwazyjny,
- 5) Białka strukturalne: OmpA
- 6) Białka uczestniczące w interakcjach z układem odpornościowym: OmpX, PagC, Rck, PagP, PgtE, FhuA, FepA
- 7) Białka biernego transportu: LamB, ScrY, FadL
- 8) Białka jako receptory dla bakteriofagów i kolicyn: OmpA, OmpW, OmpC, OmpF, FhuA, LamB

Ważną cechą błony zewnętrznej jest jej selektywna przepuszczalność, małe cząsteczki jak białka o masie do 5 kDa przenikają zgodnie z gradientem stężeń, dzięki transmembranowym białkom – porynom [120]. Poryny można podzielić za względu na przepuszczalność na kanały dyfuzji niespecyficzej oraz na kanały dyfuzji substratowo specyficznej. Występują one w komórkach bakterii Gram-ujemnych (200 tys. kopii w komórce) oraz w mitochondriach i chloroplastach [112]. Są względnie odporne na trudne warunki środowiska, takiej jak detergenty, proteazy, rozpuszczalniki organiczne, wysoka temperatura (~70°C), niskie i wysokie pH (2–13).

Poryny biorą również udział w patogenności bakterii. Białka te wydzielane przez bakterie lub uwalniane po jej lizie mogą wchodzić w interakcje z komórkami i innymi czynnikami odpornościowymi gospodarza. Ich odporność na proteazy sprawia, że ich poziom może utrzymywać się przez długi czas. Niektóre bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazują zdolność do produkcji poryn limitujących przepuszczalność antybiotyków, co nadaje im naturalną odporność [120].

1.5. Badanie reaktywności białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri*

Jak wspomiano w poprzednich podrozdziałach, białka błony zewnętrznej pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* są ważnymi i wielofunkcyjnymi strukturami. Biorą one udział nie tylko w patogenności bakterii, ale również posiadają właściwości immunogenne.

Podanie zwierzętom preparatu białek błony zewnętrznej bakterii z tej rodziny wywołuje odpowiedź immunologiczną organizmu gospodarza, która ma charakter ochronny. Wieloskładnikowe preparaty OMP izolowane ze ściany komórkowej pałeczek *Shigella flexneri* 3a i *Shigella sonnei* FI metodą Schnaitmana [109], podane podskórnie świnkom morskim (kawia domowa) chroniły je przed rozwojem zapalenia rogówki i spojówki wywoływanym doświadczalnie za pomocą homologicznego i heterologicznego chorobotwórczego szczepu tych bakterii. Działanie ochronne było również stwierdzone po podaniu nieimmunizowanym zwierzętom surowicy zawierającej swoiste przeciwciała [1].

Właściwości ochronne badanych wieloskładnikowych preparatów OMP potwierdzono również na modelu mysim. Wykazano, że myszy immunizowane preparatami OMP, izolowanymi ze ściany komórkowej różnych serotypów pałeczek *Shigella flexneri*, uzyskiwały całkowitą ochronę po zakażeniu ich patogennym szczepem tych bakterii w dawce LD₁₀₀ [82, 83, 125, 126, 127, 128]. Działanie ochronne potwierdzono również po szczepieniu zwierząt preparatami OMP izolowanymi z innych gatunków bakterii, takich jak *Shigella sonnei* FI, *Escherichia coli* i *Hafnia alvei*.

Wykazano, że ochronę wzbudzoną u myszy podaniem wieloskładnikowego preparatu OMP uzyskanego z bakterii *Shigella flexneri* 3a, można przenieść na zwierzęta nieimmunizowane przez podanie im splenocytów pochodzących od zwierząt immunizowanych. Obserwując odpowiedź immunologiczną myszy stwierdzono, że w pierwszym etapie ma ona charakter komórkowy. Komórki zdolne do przeniesienia właściwości ochronnych pojawiły się po trzech dniach od immunizacji, a limfocyty T i B po podaniu zwierzętom nieimmunizowanym chroniły je przed śmiercią po podaniu im śmiertelnej dawki patogennego szczepu *Shigella flexneri* 3a [127, 128].

Długotrwała ochrona przeciwbakteryjna zwierząt sugerowała odporność humoralną, co potwierdzono w badaniach charakteryzujących kinetykę tej odpowiedzi. Po jednorazowym podaniu myszom wieloskładnikowego preparatu OMP *Shigella flexneri* 3a (10 µg) pojawiły się w ich surowicy przeciwciała już po czterech dniach i utrzymywały się przez kolejne trzy tygodnie (test ELISA). Miano przeciwciał po podaniu kolejnych dawek preparatu białkowego sukcesywnie wzrastało, a ich poziom utrzymywał się aż przez szesnaście tygodni. Podanie surowicy zwierząt immunizowanych zwierzętom nieimmunizowanym, chroniło je przed rozwojem zakażenia wywołanym dootrzewnowym podaniem dawki LD₅₀ bakterii. Ochronę uzyskano również po zakażeniu zwierząt bakteriami o innym serotypie, a nawet bakteriami innego gatunku jak *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* czy *Salmonella* Typhimurium [125]. W kontekście opracowania szczepionki na shigellozę wyniki badań wykazujące działania immunomodulacyjne izolowanych preparatów OMP z *Shigella flexneri* 3a wzbudzające odpowiedź komórkową oraz humoralną, wskazywały na niezwykle interesujący obszar badań nad białkami błony zewnętrznej, obiecujący zarówno pod względem poznawczym jak i aplikacyjnym.

W poszukiwaniach składnika preparatu białkowego OMP, który jest odpowiedzialny za ochronę przed zakażeniem, preparat ten po izolacji ze ściany komórkowej *Shigella flexneri* 3a, poddano badaniom reaktywności z surowicami krwi ludzkiej. Za pomocą metody Western blot wykazano, że przeciwciała klasy IgA, IgG i IgM obecne w surowicy ludzkiej krwi obwodowej reagują z jednym z dwóch białek głównych *Shigella flexneri* o masie cząsteczkowej 38 kDa [132]. Obecność tych przeciwciał potwierdzono również w surowicy krwi pępowinowej, co świadczy o przekazywaniu tych przeciwciał przez łożysko od matki do dziecka oraz sugeruje ich charakter ochronny.

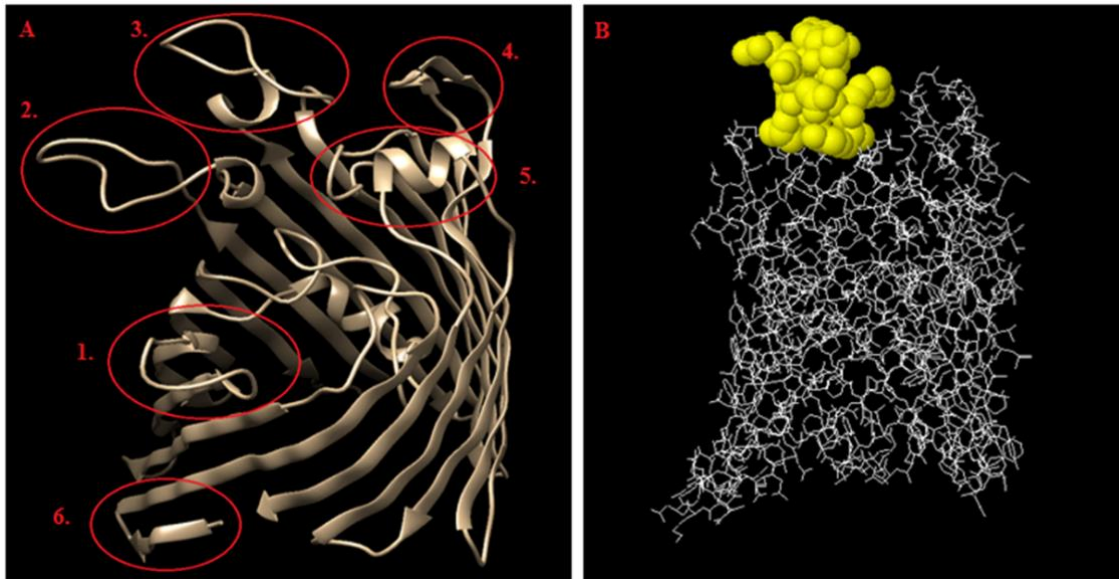
Przeciwciała skierowane na białka OMP z *Shigella flexneri* 3a oznaczono również u dzieci z niedoborami immunologicznym i dzieci z nawracającymi zapaleniami dróg

oddechowych. Statystycznie istotne różnice w poziomie przeciwciał wśród dzieci z niedoborami odporności i dzieci zdrowych [132] skłoniły nas do rozszerzenia tych badań na znacznie większej grupie pacjentów. Posiadane informacje wskazały na niezwykle istotny obszar badań, przede wszystkim w kontekście opracowania testu do oznaczania humoralnych niedoborów odporności oraz opracowania preparatu immunoglobulinowego, który może być zastosowany do suplementacji przeciwciał u pacjentów z niedoborami odporności.

Wyniki badań dotyczące reaktywności przeciwciał obecnych w surowicy krwi ludzkiej z jednym z białek głównych o masie cząsteczkowej 38 kDa (OmpC) z błony zewnętrznej *Shigella flexneri* 3a sugerowały, że białko to ma właściwości immunomodulacyjne. W celu potwierdzenia tego założenia w naszym laboratorium podjęto szereg badań, których pierwszym etapem było uzyskanie homogennego preparatu białka OmpC. Najlepsze rezultaty osiągnięto po wprowadzeniu modyfikacji do metody Arcidiacono [3], takiej jak podwójna ekstrakcja osadu bakteryjnego kwasem walerianowym, a następnie wprowadzono dwa etapy oczyszczania w systemie FPLC (filtracja żelowa i chromatografia jonowymienna). Uzyskanie homogennego białka OmpC umożliwiło podjęcie wielokierunkowych badań zarówno nad jego strukturą jak i immunoreaktywnością.

Po zsekwencjonowaniu genu odpowiedzialnego za kodowanie białka OmpC z *Shigella flexneri* 3a i porównaniu go z sekwencją genu białka OmpC z pałeczek *Shigella flexneri* 2a wykazano, że mają one 100% homologii i posiadają jednakową sekwencję aminokwasową. Sekwencja nukleotydowa została zdeponowana w bazie danych nukleotydowych GenBank (Accession No. KC865276) [51].

Wykorzystując model 3D białka OmpC oraz metody bioinformatyczne wytypowano sześć potencjalnych epitopów wiążących przeciwciała (Rycina 3) [51]. Po zsyntezowaniu peptydów o sekwencji odpowiadającej kolejnym epitopom, zdefiniowano jeden z nich jako odpowiadający za reaktywność z surowicą ludzkiej krwi pępowinowej. Mapowanie epitopu białka wiążącego przeciwciała anty-OmpC, pozwoliło na określenie jego 12-aminokwasowej sekwencji (GLNRYDERYIGC). Synteza odpowiednich peptydów i badania ich immunoreaktywności pozwoliły określić najkrótszą sekwencję aminokwasów (RYDERY) zdolną do wiązania przeciwciał surowicy ludzkiej krwi pępowinowej [51]. Warto także podkreślić, że epitop wiążący przeciwciała anty-OmpC z surowicy ludzkiej, to także epitop odpowiedzialny za wiązanie przeciwciał anty-OmpC w surowicy myszy [51].



Rycina 3. Podsumowanie badań bioinformatycznych nad OmpC. A - rozmieszczenie epitopów na powierzchni modelu 3D OmpC *Shigella flexneri* 3a; epitopy od 1 do 5 reprezentują pętle błony zewnętrznej (1– pętla II, 2– pętla IV, 3– pętla V, 4– pętla VII, 5– pętla VIII), a epitop numer 6 odpowiada pętli błony wewnętrznej i zastosowano jako kontrolę, B – lokalizacja epitopu nr 3 (RYDERY) na powierzchni OmpC. Obrazy powstały przy użyciu ElliPro Prediction i edytowane za pomocą oprogramowania Chimera; doi:10.1371/journal.pone.0070539.g002 [51].

Białka powierzchniowe bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* są od wielu lat tematem zainteresowania naszego laboratorium [51, 125, 126, 127, 128, 129, 130]. Wykazanie właściwości immunomodulacyjnych białka OmpC, uzyskanego z pałeczek *Shigella flexneri* 3a, zmapowanie pętli zawierającej epitop wiążący przeciwciała anti-OmpC surowicy ludzkiej, a także określenie jego sekwencji aminokwasowej, wskazuje na obiecujący kierunek dalszych badań związanych z otrzymaniem m.in. szczepionki na shigellozę.

Badania immunoreaktywności białka OmpC z surowicami krwi ludzi zdrowych oraz pacjentów z niedoborami immunologicznymi stanowią podstawy do opracowania testu serologicznego do oznaczania humoralnych niedoborów odporności. Reaktywność surowicy krwi pępowinowej oraz dotychczasowe badania prowadzone na modelu mysim, świadczą o potencjale ochronnym przeciwciał anti-OmpC przeciw rozwojowi zakażenia wywołanego pałeczkami *Shigella*. Potencjał ten może zostać wykorzystany przy opracowaniu optymalnej metody izolacji przeciwciał anti-OmpC oraz uzyskaniu terapeutyku do suplementacji przeciwciał.

Dotychczasowe wyniki dotyczące białka OmpC z *Shigella flexneri* 3a, stanowią obszerny i niezwykle obiecujący materiał wielokierunkowych badań nad jego reaktywnością i są szczególnie pomocne w wielu aspektach immunologii, takich jak opracowanie szczepionki na shigellozę, czy opracowanie terapeutyku do suplementacji przeciwciał u pacjentów z niedoborami humoralnymi oraz opracowanie szybkiego testu do oznaczania humoralnych niedoborów odporności. Ogromny potencjał immunoreaktywności białka OmpC jest powodem powstania niniejszej rozprawy.

2. Cele pracy

Celem realizowanych przeze mnie badań było przede wszystkim zbadanie reaktywności i oznaczenie poziomu swoistych przeciwciał anti-OmpC *Shigella flexneri* 3a w surowicach krwi osób zdrowych i pacjentów z niedoborami immunologicznymi, przeprowadzone przy zastosowaniu odpowiednich antygenów na statystycznie znamiennej grupie badanych.

Kolejny wyznaczony kierunek badań to 1) opracowanie optymalnych warunków izolacji swoistych przeciwciał anti-OmpC z ludzkiej krwi obwodowej zdrowych dawców przy użyciu wybranych antygenów takich jak: natywne białko OmpC z *Shigella flexneri* 3a, koniugat peptydu liniowego z BSA czy koniugat peptydu cyklicznego z BSA oraz rekombinowane białko OmpC, 2) zdefiniowanie najodpowiedniejszego do tego celu antygeny.

Dalszy etap realizacji badań to charakterystyka immunochemiczna przeciwciał oraz sprawdzenie ich właściwości ochronnych na modelu zwierzęcym, co bezpośrednio wiąże się z potencjalną możliwością użycia izolowanych przeciwciał jako terapeutyku do suplementacji pacjentom z humoralnymi niedoborami odporności.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał kliniczny użyty do badań – surowice krwi pacjentów i honorowych dawców krwi

Próbki krwi pochodzące od dzieci z niedoborami immunologicznymi (grupa badawcza) otrzymywano z III Katedry i Kliniki Pediatrii, Immunologii i Reumatologii Wieków Rozwojowych, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz z Oddziału Immunologii Klinicznej i Pediatrii, Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. J. Gromkowskiego we Wrocławiu dzięki współpracy z dr Aleksandrą Lewandowicz-Uszyńską.

Próbki krwi od dzieci bez niedoborów odpornościowych (grupa kontrolna) uzyskiwano z I Katedry i Kliniki Pediatrii, Alergologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z Oddziału Klinicznego Kardiologiczno-Pediatrycznego dzięki współpracy z dr Ewą Masłowską.

Do badań wykorzystywano również krew honorowych krwiodawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) im. prof. dr hab. Tadeusza Dorobisza we Wrocławiu (50-345 Wrocław, ul. Czerwonego Krzyża 5/9) otrzymywaną w ramach umowy zawartej pomiędzy IITD PAN a RCKiK.

Podsumowując, w badaniach używano próbki surowicy krwi pochodzące od: dzieci z niedoborami immunologicznymi (127), pacjentów z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych (NZDO) (83), dzieci bez obciążeń immunologicznych (40) oraz honorowych krwiodawców (54). Sumaryczna liczba próbek surowicy krwi ludzkiej pozyskanych do badań to 304. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu nr KB – 144/2020.

3.2. Szczep bakterii i warunki hodowli

Do badań wykorzystywano szczep bakterii *Shigella flexneri* 3a (PCM 1793) pochodzący z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

Hodowlę bakterii każdorazowo prowadzono na podłożu agarowym Bacto Agar (Difco) przez 24 godziny, a następnie na pożywce płynnej BHI (Brain Heart Infusion, Difco) przez 8 godzin z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, zapewniając hodowli bakterii odpowiednie napowietrzanie.

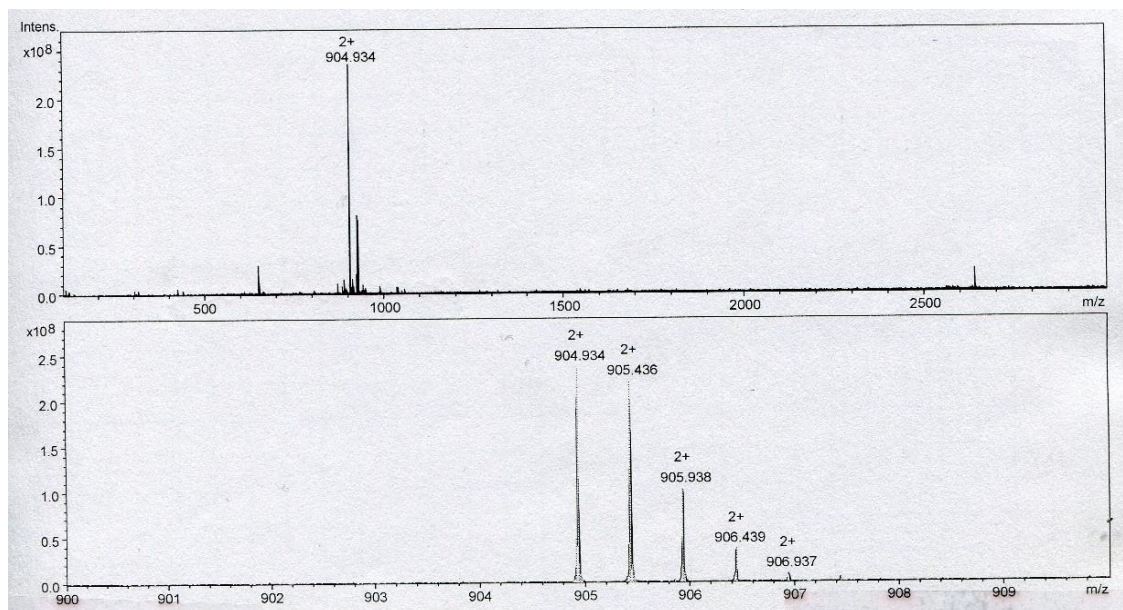
3.3. Syntetyczne peptydy zawierające epitop wiążący białka OmpC

Do badania reaktywności przeciwciał surowicy ludzkiej, oprócz natywnego bakteryjnego białka OmpC, stosowano także inne antygeny zawierające epitop tego białka wiążący przeciwciała. Dwa spośród używanych do badań antygenów, to przygotowane zgodnie z metodologią opisaną w podrozdziale 3.12. koniugaty peptydów z albuminą wołową (BSA - Bovine Serum Albumin), na powierzchni której zimmobilizowano peptydy (cykliczny lub liniowy) zawierające sekwencję swoiściw wiążącą przeciwciała anty-OmpC.

Epitop białka OmpC, wiążący przeciwciała surowicy ludzkiej, występuje w pętli nr 3 tego białka (Rycina 3), a jego najkrótsza reaktywna z przeciwciałami sekwencja to RYDERY. Biorąc pod uwagę konformację przestrzenną tej pętli, do badań reaktywności oprócz peptydu liniowego, stosowano także peptyd cykliczny odpowiadający konformacją naturalnej pętli białka OmpC.

3.3.1. Peptyd cykliczny o sekwencji [GGLNRYDERYIGK]-C

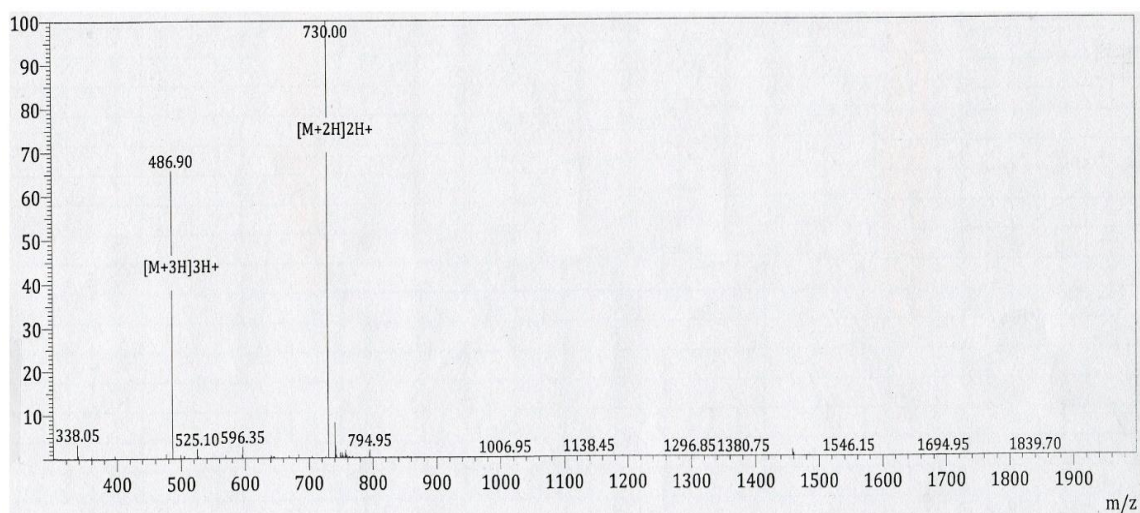
Peptyd cykliczny o sekwencji [GGLNRYDERYIGK]-C otrzymano dzięki współpracy z dr Bartoszem Setnerem z Zespołu Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zgodnie z otrzymanym świadectwem jakości produktu, peptyd ten uzyskany został na drodze syntezy organicznej. Oczyszczanie peptydu przeprowadzono za pomocą preparatywnej chromatografii cieczowej na aparacie Varian ProStar (kolumna: TSKgel ODS-120T 12TG08eh004 + Guard Column, detektor UV ($\lambda=210$ nm oraz 280 nm), objętość nasyty: 2 ml, przepływ: 7 ml/min.). Eluowano roztworem A ($H_2O + 0,1\%$ TFA) oraz B ($80\% CH_3CN/H_2O + 0,1\%$ TFA) w gradiencie roztworu B w zakresie 0–80% przez 40 minut. Otrzymano 10 mg peptydu z 200 Mm TCEP (TCEP – tris(2-carboxyethyl)phosphine) w formie zliofilizowanej. Następnie poddano go analizie masowej ESI-MS, przeprowadzonej na spektrometrach mas micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) oraz apex ultra FT-ICR 7T (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ze źródłem jonów ESI (ESI – Electrospray Ionisation) w trybie jonów dodatnich. Aparat kalibrowano przy użyciu TuneMix (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Do pomiarów stosowano roztwór $CH_3CN/H_2O/HCOOH$ (50:50:0,1 v/v/v). Wartość zmierzona m/z wynosiła 904,934, co odpowiada wartości teoretycznej jonu $[M+2H]^{2+}$ wynoszącej 904,922 (Rycina 4).



Rycina 4. Widmo masowe ESI-MS potwierdzające tożsamość otrzymanego peptydu cyklicznego o sekwencji aminokwasowej [GGLNRYDERYIGK]-C.

3.3.2. Peptyd liniowy o sekwencji GLNRYDERYIGC

Peptyd liniowy o sekwencji GLNRYDERYIGC pozyskano z firmy NOVAZYM POLSKA s. c. Zgodnie z otrzymanym świadectwem jakości produktu, peptyd uzyskano na drodze syntezy organicznej. Oczyszczanie peptydu przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej na aparacie SHIMADZU (kolumna Inertsil ODS-SP (4,6*250mm*5um), detektor UV ($\lambda=214$ nm), objętość nastrzyku: 40 μ l, przepływ: 1 ml/min.). Eluowano roztworem A ($H_2O + 0,1\%$ TFA) oraz B (acetonitryl + 0,1 % TFA). Otrzymano 15 mg peptydu w formie zliofilizowanej. Następnie poddano go analizie masowej ESI-MS w trybie jonów dodatnich. Do pomiarów stosowano roztwór 5% HAC + 8% ACN + 87% H_2O . Wyznaczona wartość m/z wynosiła 1458,00 kDa, co odpowiada masie teoretycznej 1458,60 kDa (Rycina 5).



Rycina 5. Widmo masowe ESI-MS potwierdzające tożsamość otrzymanego peptydu liniowego o sekwencji aminokwasowej GLNRYDERYIGC.

3.4. Zwierzęta stosowane w badaniach modelowych

W badaniach modelowych, dotyczących określenia właściwości ochronnych badanych antygenów, używano 6–9 tygodniowych samic myszy szczepu BALB/c każda o masie ok. 20–24 g, pochodzących z hodowli prowadzonych w Zwierzętami Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5.

Badania modelowe na myszach, zgodnie z uzyskanymi pozwoleniami LKE NR 020/2021/P1 oraz NR 066/2022/P2, przeprowadzano w Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Zwierzęta umieszczano w klatkach w standardowych warunkach i zapewniano im dostęp do pokarmu i wody. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt to $22 \pm 2^\circ\text{C}$, wilgotność $55\% \pm 10\%$. Pomieszczenia były wyposażone w klimatyzację i regulację oświetlenia 12/12 godz. Dostępny w pomieszczeniach system wentylacji eliminował przeciągi, zapewniał ogrzewanie i chłodzenie oraz odpowiednią wymianę powietrza. Wszystkie pomieszczenia spełniały warunki SPF. Zwierzęta były kontrolowane co najmniej raz dziennie przez przeszkolonego opiekuna. Myszy przed rozpoczęciem procedur, przez 5 dni, były oszwajane i przyzwyczajane do dotyku i obecności eksperymentatora, aby zminimalizować stres zwierząt w trakcie przeprowadzania procedur. Warunki, w jakich utrzymywano zwierzęta były zgodne z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UEz dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych.

3.5. Surowica myszy z przeciwciałami anti-OmpC z *Shigella flexneri* 3a

W pierwszym eksperymencie przeprowadzonym na zwierzętach, a dotyczącym badania właściwości ochronnych mysich przeciwciał anti-OmpC, używano surowicy mysiej dostępnej w laboratorium, stanowiącej materiał uzyskany z wcześniej prowadzonych badań w naszym laboratorium przez dr Annę Jarząb.

Surowica zwierząt wykorzystywana do drugiej części doświadczeń z immunizacją bierną, pochodziła od myszy biorących udział w przeprowadzonym przeze mnie eksperymencie dotyczącym immunizacji aktywnej myszy homogennym preparatem białka OmpC.

3.6. Ekstrakcja białek błony zewnętrznej wg Arcidiacono i wsp. [3]

Zawiesinę bakteryjną, po 8-godzinnej hodowli na płynnym podłożu BHI, poddawano wirowaniu przy 6000 obr./min. (rotor przepływowy 3049) na wirówce przepływowej (Heraeus, Thermo Scientific). Uzyskaną mokrą masę bakteryjną zamrażano w -80°C i liofilizowano. Suchą masę bakteryjną rozcierano na jednolity proszek w młynku. Następnie do 1 g suchej masy bakteryjnej dodawano 2 ml stężonego kwasu walerianowego (Sigma) aby wyekstrahować białka błony zewnętrznej. Zawiesinę bakteryjną rozcieńczano 4-krotnie uzyskując stężenie końcowe kwasu walerianowego wynoszące 2,3 M i inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej z użyciem mieszadła magnetycznego. Ekstrakt wirowano przez 30 minut przy 20000×g celem usunięcia pozostałości komórek, które wskutek wirowania znajdowały się w osadzie. Dla zwiększenia wydajności procesu, osad poddawano powtórnej ekstrakcji, w takich samych warunkach. Uzyskany po wirowaniu supernatant dializowano do wody, aby usunąć kwas walerianowy. Następnie, obecne w supernatancie białka precypitowano za pomocą 2–3 objętości zmrożonego (-20°C) etanolu i poddawano kilkunastogodzinnej inkubacji w tej temperaturze. Roztwór z wytrąconymi białkami wirowano przez 30 minut przy 20000×g uzyskując w osadzie białka błony zewnętrznej, które następnie zawieszano w wodzie.

Stężenie preparatu białkowego monitorowano za pomocą metody Bradford, a jego obraz elektroforetyczny rejestrowano oznaczając ruchliwość preparatu w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).

3.7. Oczyszczanie natywnego białka OmpC [49]

3.7.1. Filtracja żelowa

Uzyskany po ekstrakcji kwasem walerianowym preparat białkowy (12 mg) rozpuszczano w buforze zawierającym 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100. Pierwszy etap oczyszczania prowadzono z wykorzystaniem filtracji żelowej na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200 (GE Healthcare Life Sciences; 1,6×100 cm; HR Pharmacia) w systemie FPLC Äkta Explorer (Fast Protein Liquid Chromatography). Do równoważenia kolumny używano buforu zawierającego 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,4% Triton X-100. Wyniki rejestrowano za pomocą programu UNICORN. Rozdział białek prowadzono przy przepływie 0,3 ml/min. zbierając frakcje o objętości 2 ml. Przebieg chromatografii monitorowano mierząc absorbancję przy długości fali światła $\lambda=220$ nm, $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm przy pomocy detektora UV/VIS (Amersham Pharmacia Biotech) oraz przy pomocy elektroforezy w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Frakcje zawierające białko OmpC łączono, dializowano do wody i zagęszczano. Białko oznaczano metodą Bradford.

3.7.2. Chromatografia jonowymienna

Wstępnie oczyszczony preparat białkowy (5 mg) zawierający białko OmpC наносzono na kolumnę ze złożem jonowymiennym DE-52 (Whatman; 1,6×10 cm; HR Pharmacia) i rozdzielano w systemie FPLC Äkta Explorer. Kolumnę równoważono buforem zawierającym 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,4% Triton X-100. Rozdział prowadzono przy przepływie 0,3 ml/min w gradiencie 0,0–0,5 M NaCl, zbierając 2 ml frakcje. Próby zawierające białko OmpC łączono ze sobą, dializowano do wody i zagęszczano. Białko oznaczano metodą Bradford.

3.8. Oznaczanie białka

3.8.1. Metoda Bradford

Roztwór białka o objętości 5 μ l zmieszano z 200 μ l odczynnika Bradford (Thermo Scientific) i inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej. Jako standardu do krzywej kalibracyjnej używano roztworu BSA w zakresie stężeń od 0–20 μ g/ml lub 0–1 mg/ml w zależności od spodziewanego rzędu wielkości stężenia białka w badanej próbce, zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancję roztworu mierzono na płytce titracyjnej przy długości fali światła $\lambda = 595$ nm (BioTek).

3.8.2. Pomiar absorbancji

Absorbancję roztworu białka mierzono na spektrofotometrze Nano Drop (DeNovix; DS-11+ Spectrophotometer) nanosząc po 3 μ l badanej próbki na miejsce pomiarowe. Jako kontroli używano wody lub buforu, w którym rozpuszczone było białko.

3.9. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) [62]

Elektroforetyczny rozdział białek w warunkach denaturujących prowadzono w żelu poliakrylamidowym. Procentowość akrylamidu w żelu była dobierana odpowiednio do masy cząsteczkowej białek znajdujących się w badanej próbce. Przygotowując żele poliakrylamidowe używano roztworów, których skład i sposób przygotowania zamieszczono poniżej:

30% akrylamid/ 0,8% bis-akrylamid

30 g akrylamidu (Sigma) i 0,8 g bis-akrylamidu (Sigma) rozpuszczono w 100 ml wody, następnie przesączono przez sączek WK II (Whatman) i przechowywano w lodówce.

Bufor do żelu rozdzielającego (bufor dolny): 4,5 M Tris-HCl, 0,3% SDS, pH 8,8

13,627 g Tris (Serva) rozpuszczono w H₂O, doprowadzono pH roztworu do 8,8 za pomocą 1 M HCl (POCh). Dodano 300 mg SDS (Serva) wymieszano i uzupełniono wodą do 100 ml.

Bufor do żelu zagęszczającego (bufor górny): 0,25 M Tris-HCl, 0,2% SDS, pH 6,8

3,028 g Tris (Serva) rozpuszczono w H₂O, doprowadzono pH roztworu do 6,8 za pomocą 1 M HCl (POCh). Dodano 200 mg SDS (Serva) wymieszano i uzupełniono wodą do 100 ml.

10% Nadsiarczan amonu (APS – ammonium persulfate)

100 mg nadsiarczanu amonu (Sigma) rozpuszczono w 1 ml wody.

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (Sigma)

Roztwory do przygotowania żeli zagęszczającego i rozdzielającego z odpowiednią procentowością akrylamidu przygotowywano wg danych zawartych w Tabeli 6.

	żel rozdzielający				żel zagęszczający	
	15%	12,5%	10%	8%	6%	4%
akrylamid	7,50 ml	6,24 ml	4,95 ml	3,99 ml	1,00 ml	0,67 ml
bufor do żelu rozdzielającego/zagęszczającego	4,95 ml	4,95 ml	4,95 ml	4,95 ml	3,30 ml	3,30 ml
H₂O	2,47 ml	3,73 ml	5,01 ml	5,97 ml	0,64 ml	0,97 ml
APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	50 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	5,0 µl	5,0 µl

Tabela 6. Objętości roztworów stosowanych do przygotowania żeli poliakrylamidowych o odpowiedniej procentowości.

Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono przy stałym napięciu wynoszącym 200 V, w buforze do elektrod o składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 1% SDS. Denaturację przygotowywanych do elektroforezy preparatów białkowych przeprowadzono w buforze do prób (5-krotnie stężony; 5×SB – Sample Buffer) inkubując przez 5 minut w 95°C. Bufor do prób (5×SB): 1 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-merkaptioetanol, błękit bromofenolowy.

3.10. Metody immunoenzymatyczne

3.10.1. Przygotowanie surowicy krwi

W badaniach wykorzystano próbki surowicy krwi pochodzące od grupy złożonej z 127 dzieci z niedoborami immunologicznymi, 83 pacjentów z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych (NZDO), 40 dzieci bez obciążeń immunologicznych i 54 honorowych krwiodawców. Krew po pobraniu z nakłucia żylnego inkubowano przez 1 godzinę w 37°C, a następnie przez 1 godzinę w 4°C. Surowicę oddzielono od skrzepu elementów morfotycznych przez wirowanie 200×g przez 20 minut w 4°C. Surowice przechowywano w -80°C.

3.10.2. Test ELISA [132] [51]

Płytkę polistyrenową (96-dołkową, Maxi Sorp, Nunclon TM Surface) opłaszczano odpowiedniego antygenu rozpuszczonego w 100 μ l 0,2 M buforu węglanowego, pH 9,6 przez noc w 4°C. Antygeny niezwiązane z powierzchnią płytki usuwano przez 3-krotne płukanie dołków stosując na każde płukanie po 250 μ l buforu TBS-T (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,05% Tween 20) o pH 7,5. Wolne miejsca na płytce blokowano nakładając 250 μ l 1% roztworu BSA (Sigma) w TBS-T. Po godzinnej inkubacji odpłukiwano nadmiar BSA i наносzono po 100 μ l/dołek przeciwciał pierwszorzędowych obecnych w surowicy ludzkiej rozpuszczonych w TBS-T (w rozcieńczeniu 1:750 IgG i 1:250 IgA) i inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej, po czym dołki 3-krotnie płukano 250 μ l porcjami buforu TBS-T. Następnie na każdy dołek наносzono po 100 μ l przeciwciał drugorzędowych (rozcieńczonych w TBS-T w stosunku 1:10 tys. IgG lub 1:20 tys. IgA) skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną (Sigma) i inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu наносzono po 150 μ l substratu (AP Yellow, Sigma) zawierającego fosforan para-nitrofenylu (pNPP, *p*-nitrophenylphosphate) i inkubowano płytkę w zaciemnionym miejscu przez 30 minut. Reakcję przerywano dodaniem 50 μ l/dołek 3 M NaOH. Ekstynkcję mierzono przy długości fali światła $\lambda = 405$ nm (BioTek).

3.10.3. Transfer białek na membranę Immobilon P oraz oznaczanie ich reaktywności z przeciwciałami za pomocą metody Western Blot [132]

Białka, po rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym, transferowano na membranę PVDF (Immobilon P) w buforze 10 mM Tris, 150 mM glicyna, 20% metanol, o pH 8,3, przy stałym napięciu 100 V przez godzinę. Efektywność transferu oceniano barwiąc membranę roztworem 0,005% Ponceau S w 3% kwasie trójchlorooctowym (TCA –trichloroacetic acid) i odbarwiając w wodzie. Wysuszoną membranę traktowano metanolem, a następnie odpłukiwano w wodzie i TBS-T (TBS-T – Tris-Buffered Saline with Tween 20). Wolne miejsca blokowano 1% roztworem albuminy wołowej (BSA) w TBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membranę zanurzano w 5 ml roztworu surowicy/przeciwciał w odpowiednim rozcieńczeniu w TBS-T z 1% BSA i inkubowano przez noc w 4°C. Celem usunięcia niezwiązanych przeciwciał membranę trzykrotnie płukano w buforze TBS-T. W kolejnym etapie testu membranę poddawano godzinnej inkubacji z roztworem drugorzędowych przeciwciał skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną rozcieńczonym 10 000 razy w TBS-T. Po trzykrotnym płukaniu w TBS-T

membranę zanurzano w roztworze substratu zawierającym 5 ml buforu do fosfatazy alkalicznej (0,4 M Tris, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂), 15% BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt), 30% NBT (NBT – nitro blue tetrazolium chloride). Reakcję przerywano przez umieszczenie membrany w wodzie.

3.11. Przygotowanie złoża do chromatografii powinowactwa

Do 2 ml złoża Sepharose CL-4B (Pharmacia) dodawano 2 ml acetonitrylu i doprowadzano pH do 11,0 za pomocą roztworu 4 M NaOH. Następnie dodawano 0,2 g CNBr (bromocyjan) i inkubowano w temperaturze pokojowej na mieszadle rotacyjnym przez 30 minut pod wyciągiem utrzymując pH 11,0. Aktywowane złoże Sepharose-CNBr płukano na lejku ze spiekem przemywając 10 ml H₂O i 10 ml 0,1 M buforu węglanowego pH 8,6. Następnie dodawano 2 ml (c = 2,5 mg/ml) białka OmpC rozpuszczonego w 0,1 M buforze węglanowym o pH 8,6 i inkubowano na mieszadle rotacyjnym przez 3 godziny w temperaturze pokojowej i następnie przez noc w lodówce. Wolne grupy blokowano przez godziną inkubację z 8 ml 1 M etanoloaminy o pH 8,0 w temperaturze pokojowej. Przygotowane złoże odsączano na lejku ze spiekem, następnie przepłukiwano 10 ml porcjami wody i PBS (Mg²⁺, Ca²⁺). Zawieszono w PBS złoże nanoszono na kolumnę i przepłukiwano buforem PBS.

3.11.1. Oczyszczanie swoistych przeciwciał anti-OmpC z surowicy ludzkiej/mysiej z zastosowaniem złoża z immobilizowanym białkiem OmpC

Niewielką kolumnę (plastikowy tips o objętości 5 ml) ze złożem Sepharose CL-4B z immobilizowanym białkiem OmpC równoważono buforowanym roztworem PBS (Mg²⁺, Ca²⁺) ustalając szybkość przepływu. Następnie nanoszono rozcieńczoną w stosunku 1:1 w PBS surowicę z przeciwciałami wykazującymi powinowactwo do związanego białka OmpC. Niezwiązany z kolumną materiał odpłukiwano stosując roztwór PBS, a białka niespecyficznie związane uwalniano, używając 1 molarnego roztworu NaCl. Następnie chlorek sodu usuwano przepłukując kolumnę roztworem PBS i eluowano swoiste przeciwciała anti-OmpC stosując 3 M roztwór rodanku potasu (KCNS). Po zakończeniu procesu kolumnę przepłukiwano roztworem PBS (Mg²⁺, Ca²⁺) z dodatkiem 0,02% azydku sodu (NaN₃).

3.12. Koniugacja peptydu z białkiem nośnikowym [95]

W celu zabezpieczenia używanych do koniugacji peptydów przed dimeryzacją, rozpuszczano je w roztworze trimetylofosfiny (10-krotny nadmiar w stosunku do peptydu) i suszono pod azotem. Do koniugacji, jako białka nośnikowego, używano monomeru BSA, uzyskanego przez filtrację żelową na złożu Sephacryl S-200 (GE Healthcare Life Sciences) w systemie FPLC Äkta Explorer w 0,1 M octanie amonu wg metody 3.16.

Wolne grupy aminowe na białku nośnikowym bromoacetylowano estrem N-hydroksybursztynianowym kwasu bromoacetylowego (1 mg estru na 1 mg białka, utrzymując stężenie białka $c = 2$ mg/ml) w 0,1 M buforze węglanowym o pH 8,3. Inkubację prowadzono przez 3 godziny na mieszadle rotacyjnym w temperaturze pokojowej utrzymując stałe pH = 8,3 przy pomocy 0,1 M NaOH. Pozostały ester usuwano używając centriconu (Thermofisher scientific) (30 kDa, 20 ml 4000×g) i stosując płukanie roztworem 0,1 M dwuwęglanu sodu o pH 8,3 i finalnie otrzymywano zagęszczoną bromoacetylowaną albuminę wołową (BSA) o stężeniu 10–20 mg/ml.

Stożenie bromoacetylacji określano przez oznaczanie wolnych grup aminowych przed i po reakcji za pomocą kwasu 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowego (TNBSA). Wyszuszone pod azotem peptydy z aktywowaną grupą tiolową rozpuszczano w 0,1 M buforze węglanowym z 2 mM EDTA o pH 8,3 w stężeniu 10–50 mg/ml. Następnie wkraplano (przez ok. minutę) bromoacetylowane BSA utrzymując ~pH 8,5 za pomocą 0,1 M NaOH. Stosunek peptydu do białka w mieszaninie reakcyjnej był zawarty w przedziale 50–100 mol/mol. Utrzymywano stałe stężenie białka (2 mg/ml) dostosowując stężenie peptydu. Koniugację prowadzono przez noc w temperaturze pokojowej na mieszadle rotacyjnym. Grupy bromoacetylowe BSA, które nie związały peptydu, dezaktywowano przez godziną inkubację w temperaturze pokojowej β -merkaptioetanołem (10 μ l na 1 ml mieszaniny).

Stożenie obsadzenia BSA peptydami mierzono za pomocą techniki MALDI-TOF-MS jako matrycę stosując roztwór HCCA (kwas alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowy) w FWI (kwas mrówkowy: woda: izopropanol 3:1:2) wg metody 3.15.

3.12.1. Oznaczanie wolnych grup aminowych na powierzchni białka [114]

Roztwór białka w zakresie stężeń 30–80 μ g/ml o objętości 50 μ l lub roztwór standardu (glicyna) w zakresie stężeń 0–12 μ g/ml i 50 μ l roztworu 0,1 M buforu węglanowego o pH 8,5 inkubowano przez 2 godziny z 50 μ l 0,02 % TNBSA (kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy) w

37°C. Reakcję przerywano przez dodanie 25 µl 10% dodecylosiarczanu sodu (SDS) i 15 µl 1 M kwasu solnego (HCl). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 335$ nm.

3.13. Otrzymywanie rekombinowanego białka OmpC *S. flexneri* 3a w systemie ekspresyjnym *E. coli*

3.13.1. Przygotowanie bakterii kompetentnych

Pojedynczą kolonię *E. coli* BL21 wprowadzano do 5 ml pożywki płynnej 2×YT i hodowano przez noc w 37°C z użyciem wytrząsarki obrotowej (190 rpm). Następnie tak przygotowaną hodowlę wprowadzono do 100 ml pożywki płynnej 2×YT (w stosunku 1:20 v/v). Hodowlę kontynuowano aż do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} = 0,4-0,6$. Kolejne etapy doświadczenia prowadzono w łaźni lodowej. Po schłodzeniu bakterii (30 min.) hodowlę wirowano przez 5 minut przy 5000×g, 4°C. Osad bakterii zawieszano w połowie objętości hodowli wyjściowej zimnego 0,1 M roztworu CaCl₂ (50 ml). Kompetentne bakterie poddawano transformacji lub mrożono w -80°C z dodatkiem 15% glicerolu.

3.13.2. Transformacja bakterii kompetentnych metodą szoku termicznego

Do 200 µl zawiesiny kompetentnych pałeczek *E. coli* dodano 10 ng plazmidowego DNA i inkubowano 30 minut w łaźni lodowej. Następnie inkubowano 1 minutę w 42°C i ponownie chłodzono w łaźni lodowej przez 2 minuty. Kolejno dodawano 750 µl płynnej pożywki SB (SB – Super Broth) i hodowano przez godzinę z wytrząsaniem w 37°C. Na szalkę Petriego z pożywką LB (LB – Luria-Bertani) zestaloną agarem z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml), wysiano 10 µl zawiesiny bakterii i hodowano przez noc w 37°C.

3.13.3. Ekspresja białka rekombinowanego w hodowli płynnej

Pojedynczą kolonię pałeczek *E. coli* BL21 po transformacji wektorem pQE80L/OmpC z wklonowanym insertem genu dla osmoporyny C, wprowadzano do 50 ml płynnej pożywki 2×YT z ampicyliną (100 µg/ml) i inkubowano przez noc w 37°C na wytrząsarce obrotowej (190 rpm). Taką hodowlę wprowadzano do 250 ml podłoża hodowlanego 2×YT z ampicyliną (100 µg/ml) (1:60 v/v) i hodowano do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} = 0,4-0,6$. Produkcję rekombinowanego białka OmpC indukowano przez dodanie do hodowli roztworu 1 M IPTG (IPTG – Izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd) do osiągnięcia końcowego stężenia 1 mM. Hodowlę prowadzono przez 4 godziny w 37°C z użyciem wytrząsarki obrotowej (190 rpm), a następnie wirowano

przez 10 minut przy obrotach $7\ 000\times g$ w $4^{\circ}C$. Supernatant usuwano, osad był materiałem wyjściowym do izolacji rekombinowanego białka OmpC.

3.13.4. Sonikacja osadów bakteryjnych

Osad bakterii po odwirowaniu hodowli (0,9 g) zawieszano w 1 ml buforu do lizy zawierającym 50 mM $Na\ H_2PO_4$, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM NaCl, 5% glicerolu, 8 M mocznik. Komórki bakteryjne zawieszono w buforze poddawano sonikacji w celu degradacji ściany komórkowej (2 minuty, 0,75 cyklu, amplituda 100%). Mieszaninę wirowano przez 30 minut przy prędkości $14\ 000 \times g$. Supernatant zawierający rekombinowane białko OmpC przenoszono do nowej probówki, a do osadu dodawano 1 ml buforu do lizy i ponownie wirowano przy tych samych parametrach. Uzyskane supernatanty poddawano analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) zgodnie z metodą 3.9.

3.14. Badania na modelach zwierzęcych

3.14.1. Analiza właściwości ochronnych natywnego i rekombinowanego białka OmpC prowadzona na modelu mysim, przy zastosowaniu zakażenia dawką LD_{100} pałeczek *Shigella flexneri* 3a

Celem wzbudzenia odpowiedzi ochronnej samicy myszy szczepu BALB/c w wieku 6–9 tygodni czynnie immunizowano preparatami natywnego i rekombinowanego białka OmpC ściany komórkowej pałeczek *Shigella flexneri* 3a. Antygeny co 48 godzin podawano zwierzętom dootrzewnowo, a każda dawka użytego do immunizacji myszy preparatu to 5 μg antygeny zawieszono w 200 μl roztworu PBS. Grupę kontrolną stanowiły myszy (5 osobników w grupie), którym co 48 godzin podawano dootrzewnowo po 200 μl roztworu PBS.

Po dwóch tygodniach od pierwszej immunizacji podawano zwierzętom dootrzewnowo zawiesinę bakterii przygotowaną w roztworze PBS w dawce LD_{100} (2×10^8 bakterii/mysz). Preparaty podawano zgodnie z danymi zawartymi w Tabeli 7.

Nr grupy	Dzień 1	Dzień 3	Dzień 5	Dzień 14
1	PBS (grupa kontrolna)	PBS (grupa kontrolna)	PBS (grupa kontrolna)	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>
2	5 µg OmpC natywne	5 µg OmpC natywne	5 µg OmpC natywne	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>
3	5 µg OmpC rekombinowane	5 µg OmpC rekombinowane	5 µg OmpC rekombinowane	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>

Tabela 7. Schemat dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami natywnego i rekombinowanego białka OmpC z użyciem zakażenia myszy dawką LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 5 osobników.

Stopień indukowanej ochrony określano stosując metodę Reeda Muencha [51, 125] w procentach na podstawie liczby myszy, które w stosunku do grupy kontrolnej przeżyły 72 godz. po podaniu patogenu. Zwierzętom przed rozpoczęciem immunizacji oraz po jej zakończeniu, pobierano krew z żyły ogonowej, a po odwirowaniu krwi uzyskiwano surowicę. W surowicy oznaczano poziom przeciwciał anty-OmpC klasy IgG i klasy IgM zgodnie z metodą 3.10.2.

3.14.2. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami *Shigella flexneri* 3a w dawce LD₁₀₀

W doświadczeniu modelowym, którego celem jest sprawdzenie aktywności ochronnej przeciwciał, samice myszy szczepu BALB/c w wieku 6–9 tygodni w grupach po 5 myszy każda, immunizowano biernie, podając dootrzewnowo swoiste przeciwciała wyizolowane z ludzkiej krwi obwodowej lub surowicy mysiej uzyskanej od zwierząt immunizowanych natywnym białkiem OmpC (Tabela 8).

Nr grupy	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3
1	PBS (grupa kontrolna)	PBS	PBS
		1 godzina przerwy	
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>	
2	10 µg Ab (ludzkie)	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>	–
3	10 µg Ab (ludzkie)	10 µg Ab (ludzkie)	–
		1 godzina przerwy	
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>	
4	10 µg Ab (ludzkie)	10 µg Ab (ludzkie)	10 µg Ab (ludzkie)
		1 godzina przerwy	
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>	
5	10 µg Ab mysie)	10 µg Ab (mysie)	10 µg Ab (mysie)
		1 godzina przerwy	
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>	
6	10 µg Ab (ludzkie)	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i>	10 µg Ab (ludzkie)

Tabela 8. Schemat dootrzewnowej, biernej immunizacji myszy swoistymi przeciwciałami anti-OmpC, izolowanymi z surowicy ludzkiej/mysiej, stosowany w doświadczeniu modelowym z użyciem dawki zakażającej LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 5 osobników.

3.14.3. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami *Shigella flexneri* 3a w dawce LD₅₀

W doświadczeniu modelowym, którego celem było określenie właściwości ochronnych swoistych przeciwciał anti-OmpC, samice myszy szczepu BALB/c w wieku 6–9 tygodni, w grupach po 5 myszy, immunizowano biernie, podając dootrzewnowo przeciwciała wyizolowane z ludzkiej krwi obwodowej lub z surowicy mysiej uzyskanej od

zwierząt immunizowanych natywnym białkiem OmpC. Przeciwciała ludzkie podawano zwierzętom trzy razy (w pierwszej, drugiej i trzeciej dobie, grupa 2 i 3) stosując każdorazowo do immunizacji dawkę 50 µg (grupa 2) lub 100 µg (grupa 3) preparatu przeciwciał w 200 µl roztworu PBS. Przeciwciała mysie podawano trzykrotnie (w pierwszej, drugiej i trzeciej dobie, grupa 4) stosując każdorazowo dawkę 50 µg preparatu przeciwciał w 200 µl roztworu PBS. Grupa kontrolna myszy (grupa 1) otrzymywała dootrzewnowo trzykrotnie jedynie po 200 µl roztworu PBS/mysz. Myszy w odpowiednich grupach zakażano pałeczkami *S. flexneri* 3a w dawce LD₅₀ (7×10^7 bakterii/mysz) zawieszonymi w 200 µl roztworu PBS. Stosowany w doświadczeniu czas zakażenia to 1 godzina po drugiej immunizacji (grupa 1, 2, 3, 4). Immunizację prowadzono zgodnie ze schematem zamieszczonym w Tabeli 9.

Nr grupy	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3
1	PBS (grupa kontrolna)	PBS	PBS (grupa kontrolna)
		1 godzina przerwy	
		LD ₅₀ <i>Shigella flexneri</i>	
2	50 µg Ab (ludzkie)	50 µg Ab (ludzkie)	50 µg Ab (ludzkie)
		1 godzina przerwy	
		LD ₅₀ <i>Shigella flexneri</i>	
3	100 µg Ab (ludzkie)	100 µg Ab (ludzkie)	100 µg Ab (ludzkie)
		1 godzina przerwy	
		LD ₅₀ <i>Shigella flexneri</i>	
4	50 µg Ab (mysie)	50 µg Ab (mysie)	50 µg Ab (mysie)
		1 godzina przerwy	
		LD ₅₀ <i>Shigella flexneri</i>	

Tabela 9. Schemat biernej immunizacji myszy swoistymi przeciwciałami anty-OmpC, uzyskanymi z surowicy ludzkiej/mysiej, stosowany w doświadczeniu modelowym z użyciem dawki zakażającej LD₅₀ bakterii. W każdej grupie zwierzę było 10 osobników.

Stopień indukowanej ochrony określano, stosując metodę Reeda Muencha [51, 125] w procentach, na podstawie liczby myszy, które w stosunku do grupy kontrolnej przeżyły 72 godz. po podaniu patogenu.

3.15. Analiza MALDI-TOF-MS

Analizę BSA oraz koniugatów białkowych BSA-peptyd cykliczny/liniowy przeprowadzono z zastosowaniem techniki MALDI-TOF-MS, jako matrycę stosując kwas HCCA rozpuszczony w roztworze FWI: kwas mrówkowy/woda/izopropanol w stosunku 3/1/2 (v/v/v) w stężeniu 20 mg/ml. Na odpowiednim spocie płytki stalowej mieszano 1 μ l matrycy z 1 μ l BSA lub koniugatu BSA-peptyd, a następnie suszono na powietrzu. Analizę masową prowadzono z wykorzystaniem aparatu ultrafleXtreme i oprogramowania flexControl oraz analizowano w programie flexAnalysis (Burker Daltonics).

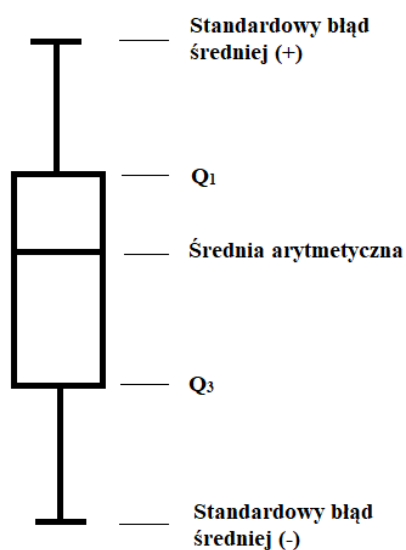
3.16. Oczyszczanie monomeru albuminy surowicy bydlęcej (BSA)

Albuminę surowicy bydlęcej (BSA) pozyskiwano z firmy Sigma-Aldrich. Zliofilizowany preparat BSA w ilości 100 mg rozpuszczano w 1 ml 0,1 M octanu amonu i nanoszono na kolumnę ze złożem Sephacryl S-200 (o wymiarach 100 \times 1,6 cm). Rozdział preparatu prowadzono w systemie FPLC przy przepływie 0,3 ml/min. zbierając 2 ml frakcje. Frakcje zawierające monomer BSA pulowano, dializowano do wody i liofilizowano.

3.17. Metody statystyczne

Wykresy oraz analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5. Do testowania normalności danych zastosowano test Shapiro-Wilka. Istotność różnic statystycznych w mianach przeciwciał przeprowadzono za pomocą testu Manna-Whitneya lub testu T-studenta. Różnicę uznano za istotną przy $P < 0,05$. Dane reprezentują średnie \pm SD z trzech powtórzeń technicznych. Symbol gwiazdki (*) oznacza $p < 0,05$, dwie gwiazdki (**) oznaczają $p < 0,01$, a trzy gwiazdki (***) $p < 0,001$.

Analizę poziomu przeciwciał w poszczególnych grupach badanych przedstawiono na wykresach pudełkowych (box-plot), gdzie Q_1 i Q_3 oznaczają kwartyle mówiące o tym, że 25% badanych znajduje się powyżej wartości Q_1 oraz że 25% badanych znajduje się poniżej wartości Q_3 (Rycinie 6).



Rycina 6. Wykres pudełkowy – graficzna prezentacja statystycznego rozkładu mian przeciwciał w obrębie badanej grupy.

Do określenia zależności między wiekiem pacjenta, a poziomem przeciwciał zastosowano współczynnik korelacji r-Pearsona. Wartość współczynnika mniejsza od zera świadczy o tendencji spadkowej, natomiast dodatnia wartość współczynnika r świadczy o współproporcjonalnym wzroście wieku i miana przeciwciał. Współczynnik r w zakresie od 0,5 do 0,5 wskazuje na słabą korelację, natomiast wartość współczynnika r w przedziale od -1,0 do -0,5 oraz od 0,5 do 1,0 wskazuje na silną korelację.

4. Wyniki

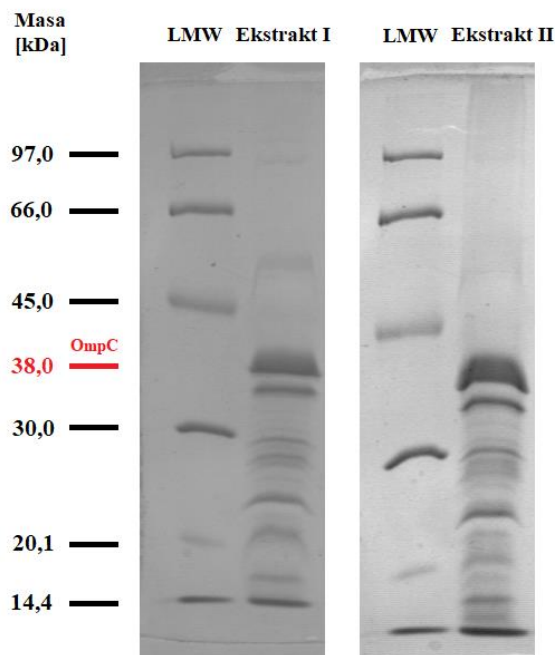
4.1. Hodowla pałeczek *Shigella flexneri* 3a

Celem uzyskania masy bakteryjnej, jako źródła białek błony zewnętrznej, przygotowano hodowlę szczepu *Shigella flexneri* 3a prowadzoną na podłożu płynnym BHI przez 8 godzin z wytrząsaniem w temperaturze 37°C (metoda 3.2.). Uzyskano 1,5 g suchej masy bakterii z 1 litra hodowli płynnej. Hodowla pałeczek *Shigella* była pierwszym etapem badań nad immunoreaktywnością białka OmpC z przeciwciałami surowiczymi. Dobór odpowiednich warunków, jak podłoże, temperatura i czasy inkubacji miał kluczowe znaczenie w prowadzeniu hodowli. Hodowlę pałeczek przerwano w fazie wzrostu logarytmicznego (trofofaza) przez odwirowanie hodowli w procesie ciągłym z zastosowaniem wirówki z rotorem przepływowym.

Zastosowanie takich warunków pozwoliło na uzyskanie maksymalnej ilości mokrej masy bakterii w optymalnej kondycji, co pozwoliło w kolejnych etapach badań na uzyskanie immunoreaktywnego preparatu białka OmpC.

4.2. Ekstrakcja białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a

Do ekstrakcji białek błony zewnętrznej użyto 27 g suchej masy bakterii i wykorzystano kwas walerianowy w stężeniu końcowym 2,3 M (metoda 3.6.). Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie z powtórным wykorzystaniem tego samego materiału. W wyniku przeprowadzonej pierwszej ekstrakcji uzyskano 120 mg mieszaniny białek (Ekstrakt I) zawierającej białko OmpC. Z drugiej ekstrakcji uzyskano 35 mg preparatu białkowego (Ekstrakt II). Ze względu na podobieństwo składu białkowego w obydwu ekstraktach, w których przeważającą ilość stanowiło białko OmpC, obydwa preparaty ze sobą połączono (Rycina 7).



Rycina 7. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów (I, II) białek błony zewnętrznej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, po dwóch etapach ekstrakcji z użyciem kwasu walerianowego.

Istnieje wiele metod ekstrakcji białek bakteryjnych jak metoda Schnaitmana [109], metoda Arcidiacono i wsp. [3] z użyciem kwasu walerianowego, liza komórek (szok osmotyczny) czy trawienie enzymatyczne. Dobór metody jest ściśle uzależniony od rodzaju materiału ekstrakcyjnego (komórki prokariotyczne, tkanki, bakterie) oraz od charakteru białka, które będzie izolowane (białka wewnętrzkomórkowe/zewnątrzkomórkowe).

Białko OmpC jest białkiem błonowym *Shigella flexneri* i jednocześnie jednym z białek głównych tych pałeczek obok białek OmpA, OmpF i OmpX [130]. Bardzo ważnym krokiem, od którego zaczyna się ekstrakcję tych białek błonowych, jest ich solubilizacja ze środowiska lipidowego. Zależna jest ona głównie od wyboru odpowiedniego detergentu i jego stężenia. Ma to szczególne znaczenie, gdy chcemy oczyścić białka w formie natywnej.

W metodzie Schnaitmana używamy niejonowym detergentem jest Triton X-100. Po rozbiciu ściany komórek bakterii i usunięciu ich fragmentów, zastosowanie 2% roztworu Tritonu X-100 w odpowiednim buforze w obecności 5 mM EDTA jako czynnika chelatującego, pozwala po ultrawirowaniu uzyskać wieloskładnikowy preparat OMP w postaci rozpuszczonej. Przewagę nad metodą Schnaitmana wykazuje metoda z użyciem kwasu walerianowego nie tylko ze względu na prostszą procedurę, ale co ma

kluczowe znaczenie, z uwagi na uzyskanie w preparacie znacznej przewagi białek głównych (w tym białka OmpC) nad innymi białkami ściany komórkowej *Shigella flexneri* (Rycina 7). Ekstrakcja ta przede wszystkim to procedura krótka i generalnie jednoetapowa. Liza komórek bakterii *Shigella* kwasem walerianowym i selektywna rozpuszczalność osmoporyny OmpC, jest możliwa dzięki stabilności trimerycznego kompleksu powstającego w tym procesie. Oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe, które stabilizują wyższorzędowe struktury OmpC nie ulegają rozerwaniu w kwasie walerianowym.

Zastosowanie metody Arcidiacono i wsp. [3] do izolacji OmpC *Shigella flexneri* 3a, znacznie skróciło i uprościło procedurę. Wydajność otrzymanego tą metodą preparatu OmpC jest porównywalna z wydajnością preparatów OmpC otrzymywanych z użyciem detergentu [109]. Oczyszczenie poszczególnych białek czy peptydów z mieszaniny jest ważnym zagadnieniem w biochemii białek. Przeprowadzona przez nas zmodyfikowana dwukrotna ekstrakcja kwasem walerianowym, znacznie podwyższyła wydajność uzyskiwanych preparatów białek błony zewnętrznej kilku gatunków bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym *Shigella flexneri*. Z dostępnych obecnie metod izolacji bakteryjnych białek błonowych, metoda z wykorzystaniem kwasu walerianowego daje największą procentową zawartość białka OmpC w stosunku do pozostałych białek.

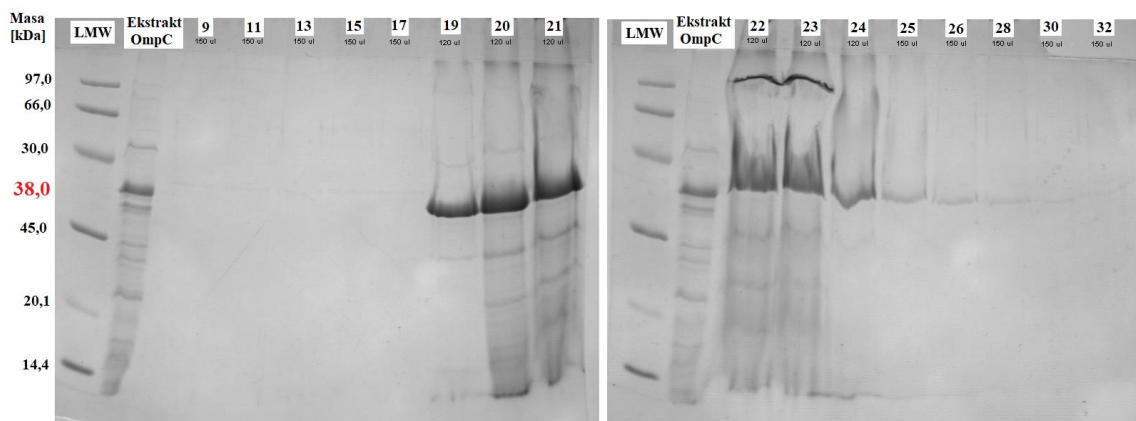
Uzyskany preparat białkowy zawierał natywne białko OmpC o prawidłowej strukturze, co wykazano w testach immunoenzymatycznych typu Western Blot (Rycina 11). Tak przygotowany preparat to doskonały materiał wyjściowy do poddania go oczyszczaniu celem uzyskania homogennego preparatu białka OmpC.

4.3. Oczyszczanie białka OmpC

Otrzymanie homogennego preparatu białka OmpC, z wieloskładnikowego preparatu uzyskanego drogą ekstrakcji kwasem walerianowym, stanowi proces o charakterze dwuetapowym. W pierwszym etapie oczyszczania zastosowano metodę filtracji żelowej, a w drugim etapie oczyszczono preparat do homogenności na drodze chromatografii jonowymiennej. W procesie oczyszczania białka ważne jest, aby nie straciło ono swojej struktury i naturalnej konformacji przestrzennej. Ma to niebagatelne znaczenie przy dalszym użyciu tego białka w testach immunoreaktywności. Z tego względu, poszczególne etapy oczyszczania powinny być krótkie i nie powinno się stosować w nich komponentów, które mogą denaturować jego strukturę.

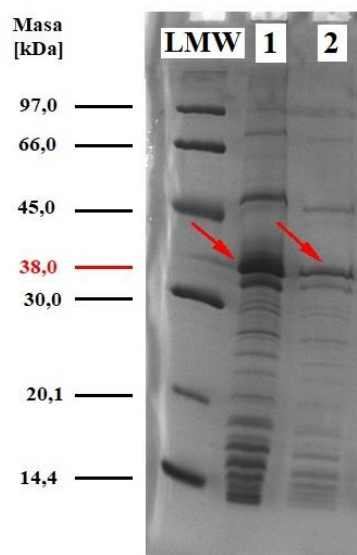
4.3.1. Filtracja żelowa

Uzyskany w wyniku ekstrakcji kwasem walerianowym preparat białkowy (15 mg) rozpuszczono w buforze zawierającym 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100. Oczyszczanie uzyskanego ekstraktu i rozdział białek przeprowadzono zgodnie z metodologią zawartą w rozdziale nr 3.7.1 z zastosowaniem kolumny szklanej o wymiarach 100×1,6 cm ze złożem Sephacryl S-200. Rozdział peowadzono w systemie FPLC przy przepływie 0,3 ml/min., zbierając 2 ml frakcje. Frakcje zawierające białko OmpC, oznaczone na Rycinie 8 numerami 19–26 (38–52 ml) spulowano, wydializowano do wody i zagęszczono. Uzyskany preparat scharakteryzowano stosując elektroforezę w warunkach denaturujących SDS-PAGE.



Rycina 8. Obraz uzyskany po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący skład białkowy ekstraktu z *S. flexneri*. Frakcje 9–32 otrzymane po oczyszczeniu preparatu na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200.

*na pojedynczą ścieżkę żelu naniesiono po 120–150 µl liofilizowanych frakcji.



Rycina 9. Obraz uzyskany po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym, przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) ilustrujący skład białkowy ekstraktu z błony komórkowej *Shigella flexneri* 3a (1) oraz preparatu białek (2) po pierwszym etapie oczyszczania metodą filtracji żelowej.

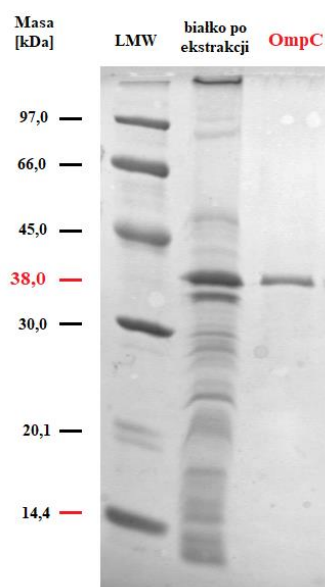
W wyniku przeprowadzonego pierwszego etapu oczyszczania wieloskładnikowego preparatu metodą filtracji żelowej (Rycina 8), otrzymano preparat o zawartości 5 mg białka, w którym białko OmpC stanowiło główną frakcję (Rycina 9 ścieżka nr 2 na żelu). Białko OmpC stanowi główny składnik w analizowanych próbach. Uzyskany obraz elektroforetyczny jednoznacznie wskazuje na większą zawartość białka OmpC w preparacie w stosunku do ilości pozostałych białek obecnych w badanym preparacie. Białko OmpC jest białkiem naturalnie występującym w błonie zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri*. Ze względu na środowisko występowania, w jego strukturze pierwszorzędowej, znajduje się wiele aminokwasów hydrofobowych, które pozwalają mu na pełnienie swoich funkcji w lipidowym środowisku przezbłonowym. Determinuje to hydrofobowość całej cząsteczki utrudniając tym samym rozpuszczanie tego białka w roztworach wodnych.

Zasadniczym etapem oczyszczania poekstrakcyjnego preparatu białkowego był dobór odpowiedniego środowiska. Ze względu na słabą rozpuszczalność białek błonowych konieczne było zastosowanie detergentu. W buforze do równoważenia kolumny chromatograficznej zastosowano 0,4% Triton X-100, co gwarantowało, że białka nie wytrącały się z przygotowanego preparatu. Ważnym etapem oczyszczania białka OmpC było dobranie złoża pozwalającego na rozdzielenie się poszczególnych białek z poekstrakcyjnej mieszaniny. Separacja białek oparta na filtracji żelowej polegała na wykorzystaniu porowatej struktury ziaren żelu oraz zjawiska dyfuzji białek oraz solwentu.

W celu efektywnego rozdzielania mieszaniny dobrano takie złożenie, aby porowatość umożliwiała migrację cząsteczek w głąb ziaren żelu. Wniknięcie cząstki w pory wydłużyło czas migracji białek, co zwiększyło jakość rozdzielania. Wielkość porów złożenia umożliwiająca skuteczną separację białka OmpC wynosi ok. 38 kDa. Odpowiednim złożeniem do rozdzielania białek tej wielkości okazał się Sephacryl S-200 i S-300, którego wielkość porów umożliwiła separację białek w zakresie mas odpowiednio 5–250 oraz 10–1500 kDa. Złożenie Sephacryl S-200 wielkość swoich porów ma zbliżoną do białka OmpC, co gwarantowało osiągnięcie odpowiedniej jakości rozdzielania.

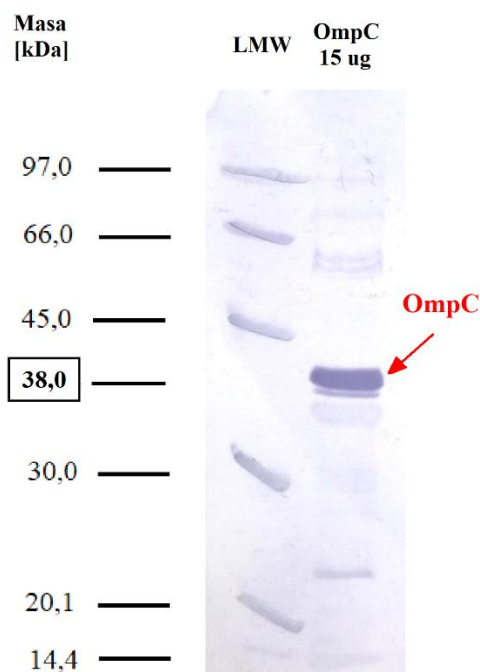
4.3.2. Chromatografia jonowymienna

Uzyskany zagęszczony preparat białkowy (5 mg) (Rycina 9, ścieżka nr 2 na żelu) po filtracji żelowej na złożeniu Sephacryl S-200 naniesiono na kolumnę ze złożeniem jonowymiennym DE-52. Kolumnę zrównoważono buforem zawierającym 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,4% Triton X-100. Oczyszczanie przeprowadzono przy przepływie 0,3 ml/min. w gradiencie 0,0–0,5 M NaCl, zbierając frakcje o objętości 2 ml. Frakcje zawierające białko OmpC spulowano, wydializowano do wody i zagęszczono stosując ultrafiltrację na Amiconie (10 kDa, Millipore). Białko w preparacie oznaczono metodą Bradford, otrzymano 2,0 mg homogennego preparatu OmpC (Rycina 10).



Rycina 10. Obraz elektroforetyczny przedstawiający ekstrakt białkowy po izolacji z błony zewnętrznej *Shigella flexnerii* 3a oraz homogenny preparat białka OmpC otrzymany po chromatografii jonowymiennnej na złożeniu DE-52 (5 µg).

Uzyskany homogenny preparat białka OmpC (15 μ g) po rozdziale elektroforetycznym i transferze na membranę Immobilon P, poddano badaniu oddziaływania z surowicą ludzką, określając metodą Western Blot jego reaktywność z obecnymi w surowicy ludzkiej przeciwciałami anti-OmpC (Rycina 11).



Rycina 11. Reaktywność preparatu białka OmpC z surowicą ludzką oznaczona metodą Western Blot.

4.3.3. Wydajność oczyszczania białka OmpC

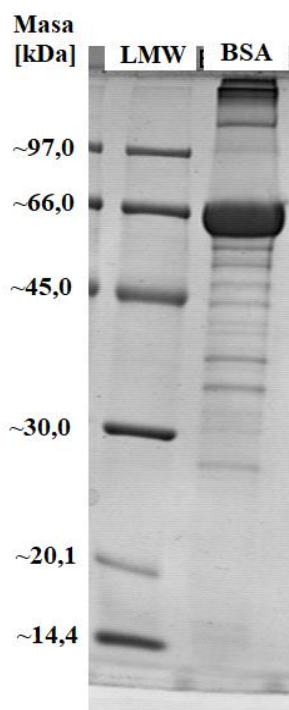
Zastosowanie dwuetapowego oczyszczania ekstraktu białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a z użyciem filtracji żelowej i chromatografii jonowymiennej, pozwoliło w przypadku chromatografii jonowymiennej na uzyskanie homogenego preparatu z wydajnością 36%. Cały proces oczyszczania 15 mg mieszaniny białek błony zewnętrznej otrzymanych w wyniku ekstrakcji kwasem walerianowym, pozwolił na uzyskanie 2 mg homogenego preparatu białka OmpC. Całkowita wydajność procesu wynosiła 13,3%. Wydajność procesów uzyskaną na poszczególnych etapach oczyszczania ilustruje Tabela 10.

Białka błony zewnętrznej (OMP)	Ilość uzyskanego białka na poszczególnych etapach oczyszczania [mg]	Wydajność [%]
OmpC po ekstrakcji z komórek bakteryjnych	15	100,0
OmpC po filtracji żelowej (Sephacryl S-200)	5	33,3
OmpC po chromatografii jonowymiennej (DE-52)	2	36,0
wydajność całkowita	15 → 2	13,3

Tabela 10. Wydajność oczyszczania białka OmpC na poszczególnych etapach oraz całkowita wydajność procesu.

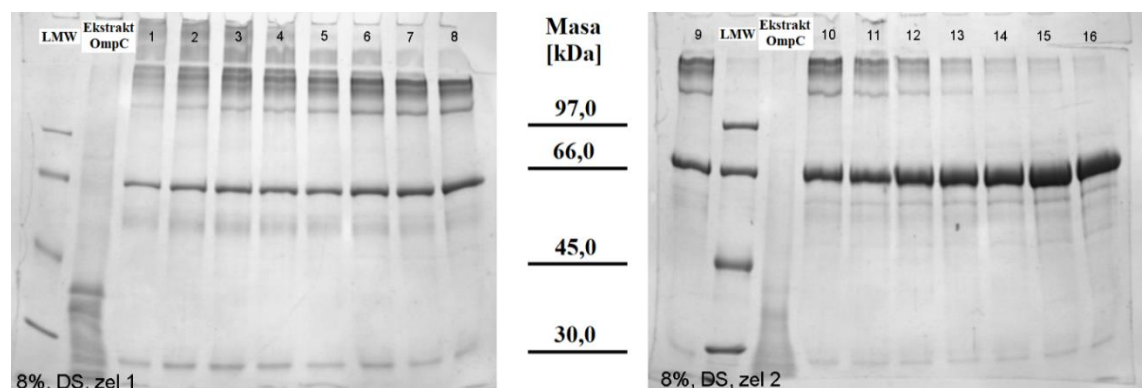
4.4. Oczyszczanie monomeru albuminy surowicy bydlęcej (BSA)

Albuminę surowicy bydlęcej pozyskano z firmy Sigma-Aldrich. Zliofilizowany preparat BSA w ilości 100 mg rozpuszczono w 1 ml 0,1 M octanu amonu i naniesiono na kolumnę ze złożem Sephacryl S-200 (Rycina 12).



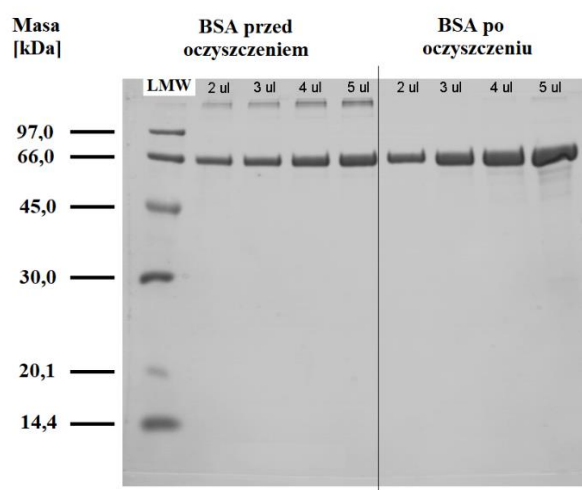
Rycina 12. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący preparat BSA przed procesem oczyszczania.

Rozdział prowadzono w systemie FPLC przy przepływie 0,3 ml/min. zbierając 2 ml frakcje. Frakcje zawierające wyłącznie monomer BSA spulowano, wydializowano do wody i zliofilizowano uzyskując 36 mg preparatu białka (Rycina 13).



Rycina 13. Obraz uzyskany po elektroforezie w 8% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący skład białkowy poszczególnych frakcji po oczyszczaniu BSA na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200.

Uzyskany preparat (po odrzuceniu frakcji zanieczyszczonych innymi białkami) zawiera monomer białka BSA w znacznej przewadze nad pozostałymi białkami (Rycina 14). Na Rycinie 14 widać dużą zawartość białek o dużej masie (kolagen, dimery BSA) w górnej części elektroforogramu, które odrzucono w filtracji żelowej pozostawiając monomeryczne białko BSA.



Rycina 14. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący preparat BSA przed i po oczyszczeniu na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200 nanoszony w dawkach 2, 3, 4 i 5 μ g.

4. 5. Koniugacja peptydów z białkiem nośnikowym

Na podstawie analizy wcześniej opublikowanych wyników badań zespołu naszego laboratorium, w których stwierdzono, że epitop o sekwencji GLNRYDERYIGC wykazywał się największą immunogennością i był epitopem wiążącym ludzkie przeciwciała anti-OmpC [51, 52], zdecydowano o zsyntetyzowaniu takiego peptydu w dwóch konformacjach przestrzennych (liniowy i cykliczny) i użyciu ich do realizacji dalszych etapów badań.

Otrzymany, dzięki współpracy z Zespołem Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, peptyd cykliczny o sekwencji [GGLNRYDERYIGK]-C (rozdział 3.3.1., Rycina 4) oraz pozyskany z firmy NOVAZYM peptyd liniowy o sekwencji GLNRYDERYIGC (rozdział 3.3.2., Rycina 5), były podstawą do przygotowania koniugatów.

Dysponując odpowiednimi materiałami (peptyd liniowy, peptyd cykliczny) zaprojektowano i przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.12. dwa koniugaty tych peptydów z białkiem nośnikowym, jakim był monomer albuminy surowicy bydlęcej (BSA) o masie 66,5 kDa. Następnie zbadano reaktywność tych koniugatów z przeciwciałami anti-OmpC oraz określono, czy różnice w konformacji przestrzennej peptydów użytych do koniugacji, mają wpływ na prezentowanie epitopu wiążącego przeciwciała i tym samym mogą mieć wpływ na oznaczenie poziomu swoistych przeciwciał w surowicy ludzkiej.

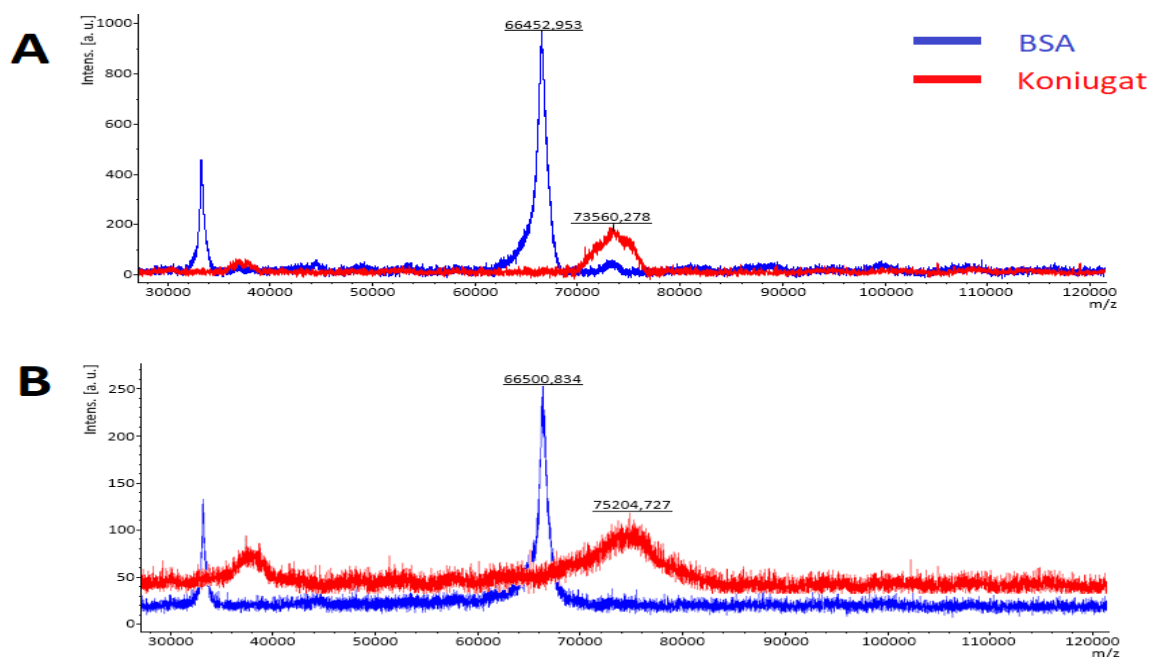
W dalszej części pracy dla uproszczenia, koniugat BSA-peptyd cykliczny będzie nazywany koniugatem cyklicznym, natomiast koniugat BSA-peptyd liniowy nazywany będzie koniugatem liniowym.

4.6. Synteza koniugatu BSA-peptyd

Stopień obsadzenia białka nośnikowego (BSA) peptydami wyznaczono za pomocą techniki MALDI-TOF-MS (zgodnie z metodą nr 3.15). Jako matrycę stosowano roztwór HCCA (kwas alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowy) w FWI (kwas mrówkowy:woda:izopropanol w stosunku objętościowym 3:1:2). Liczbę przyłączonych cząsteczek peptydów do BSA wyznaczono z ilorazu różnicy masy koniugatu i masy BSA oraz masy peptydu (Rycina 15 i 16).

$$\text{Stopień obsadzenia} = \frac{m_{\text{koniugatu}} - m_{\text{BSA}}}{m_{\text{peptydu}}}$$

Rycina 15. Obliczanie stopnia obsadzenia białka nośnikowego peptydami.



Rycina 16. Widma mas BSA oraz koniugatu BSA–peptyd cykliczny (A) oraz koniugatu BSA-peptyd liniowy (B) otrzymane za pomocą techniki MALDI-TOF-MS (zgodnie z metodą nr 3.15).

Na podstawie otrzymanych wyników obliczono średnie obsadzenie białka nośnikowego (BSA) peptydami:

A. Koniugat BSA/peptyd cykliczny

$$\text{Stopień obsadzenia} = \frac{73560,278 - 66452,953}{1807,868} = 3,931$$

B. Koniugat BSA/peptyd liniowy

$$\text{Stopień obsadzenia} = \frac{75204,727 - 66500,834}{1458,000} = 5,970$$

Obliczone w oparciu o metodę MALDI-TOF-MS masy BSA oraz koniugatów pokazują większą wartość średnią masy cząsteczek koniugatów niż masa cząsteczki BSA, co świadczy o obsadzeniu BSA peptydami. Wyznaczona masa monomeru BSA wynosi 66,45 kDa oraz 66,50 kDa, co pokrywa się z danymi (66,27 kDa) literaturowymi [47].

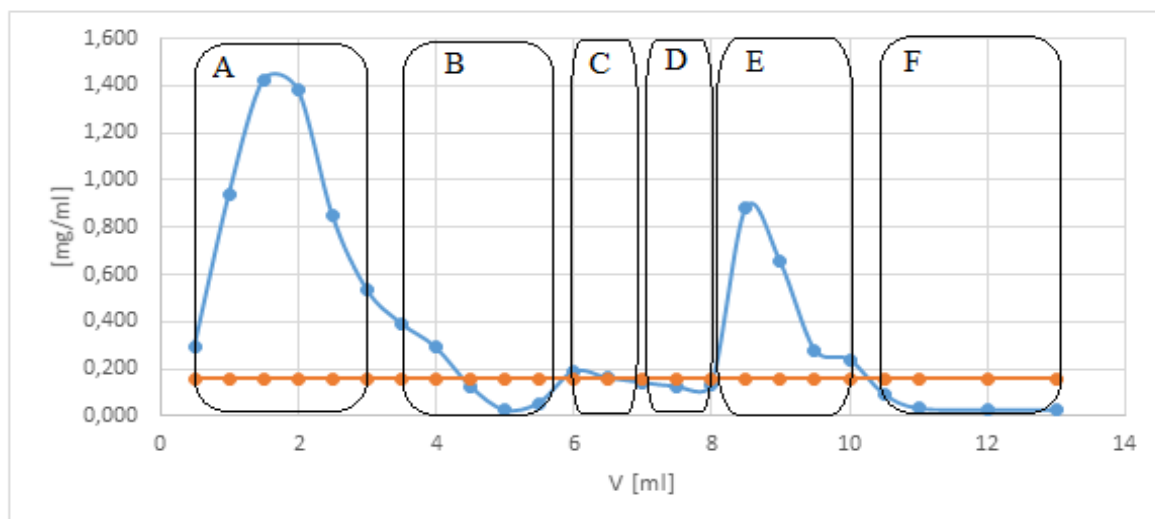
Piki koniugatów na widmie masowym (kolor czerwony na Rycina 16) mają kształt dzwonu, co świadczy o różnym stopniu obsadzenia białka nośnikowego peptydami. Intensywność pików pochodzących od koniugatów maleje równomiernie w obu kierunkach, przez co łatwo można obliczyć średnie obsadzenie peptydami. Średnio na jedną cząsteczkę BSA doszło do związania 4 cząsteczek peptydu cyklicznego oraz 6 cząsteczek peptydu liniowego. Różnica w liczbie peptydów związanych z BSA wynikać może z ich konformacji przestrzennej. W koniugacie peptydy z jednej strony przyczepione są do białka nośnikowego, a z drugiej strony eksponowane są na zewnątrz cząsteczki, co zwiększa ich dostępność dla np. przeciwciał.

Jak wiadomo, epitop białka OmpC wiążący ludzkie przeciwciała znajduje się w jednej z jego pętli (nr 3) zlokalizowanej na zewnątrz błony komórki bakteryjnej (Rycina 3) [51]. Peptydy o strukturze cyklicznej mają naśladować swoją konformacją przestrzenną naturalne ułożenie epitopu wiążącego. Pętla tego peptydu zajmuje więcej przestrzeni wokół białka nośnikowego, co sprawiło, że nie we wszystkich możliwych miejscach cząsteczki BSA (zdolnych do związania peptydu) mogły przyłączyć się peptydy. Peptyd liniowy, który zajmuje mniej przestrzeni wokół cząsteczki BSA, mógł wysycić to białko nośnikowe w większym stopniu niż peptydy cykliczne.

4.7. Uzyskanie swoistych przeciwciał anti-OmpC z użyciem chromatografii powinowactwa do immobilizowanego białka OmpC na kolumnie ze złożem Sepharose CL-4B

Powinowactwo przeciwciał anti-OmpC obecnych w surowicy ludzkiej krwi obwodowej określono stosując złożę Sepharose CL-4B, na którym immobilizowano homogenne białko OmpC po uprzedniej bromoacetylacji. Tak przygotowaną kolumnę ze złożem do chromatografii powinowactwa zrównoważono buforowanym fosforanem roztworem soli fizjologicznej (PBS). Na złożę naniesiono surowicę rozcieńczoną roztworem PBS w stosunku 1:1 (Rycina 17 A), a nadmiar niezwiązanego materiału usunięto stosując roztwór PBS (Rycina 17 B). Białka związane niespecyficznie usunięto stosując 1 M roztwór chlorku sodu (NaCl) (Rycina 17 C), a następnie kolumnę wypłukano za pomocą roztworu PBS (Rycina 17 D).

Przeciwciała oddziałujące swoiście z białkiem OmpC uwolniono z kolumny stosując 3 M roztwór rodanku potasu (KCNS) (Rycina 17 E). Następnie kolumnę odpłukano roztworem PBS (Rycina 17 F). Frakcje zawierające swoiste przeciwciała połączono, zagęszczono i rodanek potasu (KCNS) odpłukano wodą stosując Amicon z membraną filtracyjną 30 kDa (Merck Millipore).



Rycina 17. Profil elucji przeciwciał surowicy ludzkiej krwi obwodowej z kolumny powinowactwa ze złożem Sepharose CL-4B z immobilizowanym białkiem OmpC. Linia niebieska pokazuje stężenie białka mierzone w aparacie nano-drop, kolorem czerwonym zaznaczono absorbancje roztworu do elucji przeciwciał.

Do izolacji przeciwciał wybrano surowicę ludzkiej krwi obwodowej o wysokiej reaktywności z bakteryjnym białkiem OmpC. W pierwszym etapie izolacji przeciwciał na kolumnę naniesiono surowicę rozcieńczoną (1:1) roztworem PBS. Zawarte w niej przeciwciała swoiste względem immobilizowanego białka zostały związane, natomiast pozostałe przeciwciała oraz inne niezwiązane komponenty surowicy zostały usunięte po przepłukaniu złoża buforowanym roztworem soli fizjologicznej. Do złoża związało się wiele cząsteczek z surowicy o różnym powinowactwie i sile wiązania względem białka OmpC. Celem usunięcia cząsteczek, które wykazują niską swoistość wiązania, złożo płukano 1 M roztworem chlorku sodu. Spowodowało to, że na złożu związane pozostały tylko przeciwciała o odpowiednio dużej sile wiązania. Odpłukane białka stanowiły nieznaczną część względem białek związanych, o czym świadczy niski sygnał w bramce C uwidoczniony na Rycinie 17. Uwolnienie związanych swoistych anti-OmpC przeciwciał nastąpiło po elucji 3 M rodankiem potasu (KCNS) (Rycina 17 E).

Przeciwciała są glikoproteinami, których nawet nieznaczna zmiana struktury przestrzennej, może diametralnie zmienić ich właściwości, przez co łatwo tracą powinowactwo i swoistość. Z tego względu, wyizolowane przeciwciała bezzwłocznie zagęszczono i przepłukano roztworem PBS na kolumnie Amicon z membraną 30 kDa, aby usunąć rodanek potasu, a następnie zmieszano w stosunku 1:1 z glicerolem i zamrożono celem użycia do kolejnych testów.

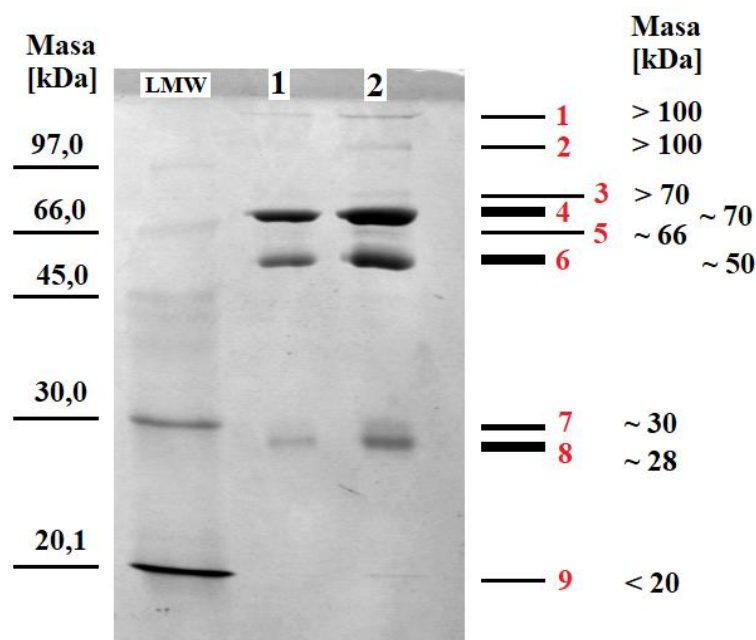
Kolumnę ze złożem Sepharose CL-4B–OmpC zrównoważono roztworem PBS z dodatkiem 0,1% azydku sodu (NaN₃) i przechowywano w lodówce do użycia w następnych doświadczeniach izolacji swoistych przeciwciał.

Z jednokrotnej izolacji przeciwciał, przy użyciu 4 ml złoża Sepharose CL-4B–OmpC i 500 µl surowicy krwi ludzkiej (1:1 w PBS) uzyskano 600 µl przeciwciał anti-OmpC (1:1 PBS:glicerol) o stężeniu 355 µg/ml (213 µg) (Tabela 11).

Surowica [µl]	Objętość wyizolowanych przeciwciał [µl]	Stężenie izolowanych przeciwciał [µg/ml]	Masa izolowanych przeciwciał [µg]	Wydajność [%] (masa : objętość)
250	600	355	213	0,0852

Tabela 11. Wydajność procesu izolacji przeciwciał anti-OmpC z surowicy ludzkiej krwi na kolumnie ze złożem Sepharose CL-4B–OmpC.

W izolacji przeciwciał kluczowe jest otrzymanie produktu w formie aktywnej o wysokiej swoistości do badanego antygeny, ważna jest także czystość preparatu oraz możliwie jak największa wydajność. Takie cechy otrzymanego preparatu pozwoliły na zastosowanie go do kolejnych etapów badań nad immunoreaktywnością i stały się podstawą do uzyskania finalnego produktu, jakim jest preparat do suplementacji przeciwciał anti-OmpC u osób z niedoborami. Charakteryzując uzyskany preparat, wyizolowane i zagęszczone przeciwciała poddano elektroforezie w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących SDS-PAGE (Rycina 18).



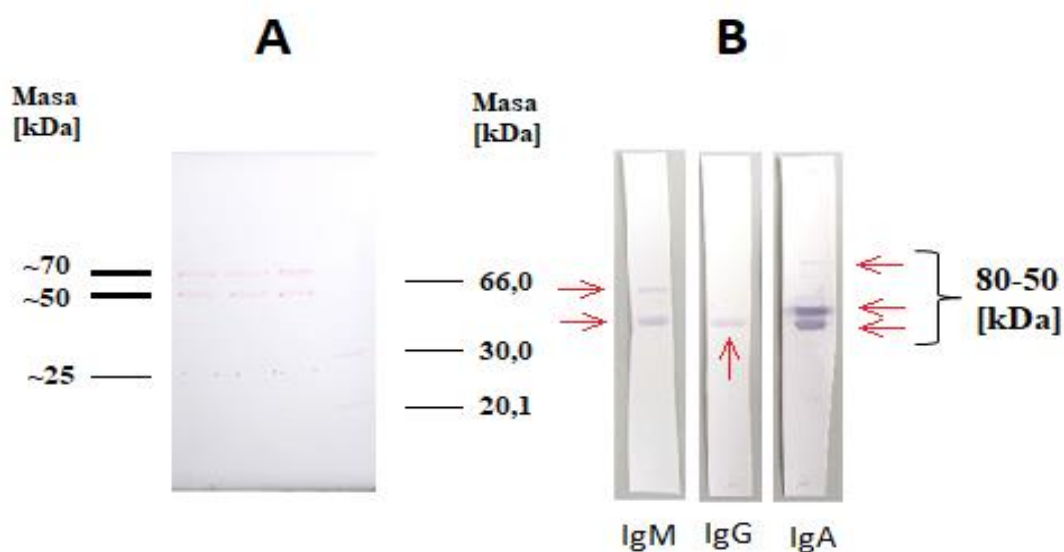
Rycina 18. Elektroforeza SDS-PAGE przeciwciał anti-OmpC wyizolowanych z ludzkiej krwi za pomocą chromatografii powinowactwa ze złożem Sepharose CL-4B–OmpC. Ścieżki 1 oraz 2 zawierają te same przeciwciała w różnym stężeniu.

Jak widać na rycinie 18, przedstawiającej obraz elektroforetyczny zdenaturowanych przeciwciał anti-OmpC, na ścieżkach oznaczonych numerami 1 oraz 2 widoczna jest mieszanina różnych klas przeciwciał anti-OmpC w dwóch różnych stężeniach. Przeciwciała pozyskane na drodze chromatografii powinowactwa zawierają różne klasy przeciwciał swoiście wiążących białko OmpC. Ze względu na obecne w mieszaninie różne klasy immunoglobulin, w otrzymanym obrazie elektroforezy, widocznych jest wiele prążków pochodzących od poszczególnych łańcuchów tych przeciwciał. Ilości poszczególnych frakcji białkowych zaznaczone są liniami różnej grubości, co odzwierciedla przewagę ilościową danego białka.

Na rycinie 18 na czerwono oznaczono białka o dużej masie (nr 1 i 2) powyżej 100 kDa, którymi mogą być zanieczyszczenia (np. kolagen), lub przeciwciała, które nie uległy denaturacji. Numerami 4 oraz 6 na czerwono oznaczono białka o masach odpowiednio ok. 70 i ok. 50 kDa, które pochodzą od łańcuchów ciężkich przeciwciał, klas których w mieszaninie jest najwięcej. Podczas gdy oznaczone na czerwono nr 3 (ok. 70 kDa) i nr 5 (ok. 66 kDa) to białka pochodzące również od łańcuchów ciężkich, ale przeciwciał klas, których miano we krwi jest niższe. Natomiast zaznaczone na czerwono nr 7 (~30 kDa) i nr 8 (~28 kDa) to z kolei łańcuchy lekkie przeciwciał, a nr 9

przedstawia czoło elektroforezy w którym znajdują się peptydy i białka o niskiej masie cząsteczkowej będące zanieczyszczeniami.

Uzyskany obraz elektroforezy zgodny jest z danymi literaturowymi, w których można znaleźć informacje o masach poszczególnych łańcuchów przeciwciał: masa ogólna przeciwciał 150–970 kDa (masa IgG, to ok. 150 kDa, natomiast IgM nawet ponad 900 kDa), łańcuch ciężki ~50 kDa, łańcuch lekki ~22–25 kDa [93, 134]. Przedstawiony na rycinie 18 obraz elektroforezy wskazuje, że preparat wyizolowany z zastosowaniem chromatografii powinowactwa zawiera swoiste przeciwciała anti-OmpC, co zgodne jest z rezultatami uzyskanymi przez Li i wsp. [70], chociaż dotyczącymi charakterystyki elektroforetycznej przeciwciał przeprowadzonej przez autorów w nieco odmiennych warunkach. Rozdzielone łańcuchy przeciwciał przetransferowano na membranę Immobilon P i wykonano metodą Western Blot analizę ich reaktywności z przeciwciałami drugorzędowymi charakterystycznymi dla różnych klas ludzkich immunoglobulin (Rycina 19).



Rycina 19. Swoiste przeciwciała anti-OmpC (A) wyizolowane z ludzkiej surowicy za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu Sepharose CL-4B-OmpC po rozdziale elektroforetycznym poszczególnych łańcuchów przeciwciał w warunkach denaturujących SDS-PAGE i po transferze na membranę Immobilon P, wybarwione Panceau red (B) reaktywność poszczególnych łańcuchów swoistych przeciwciał anti-OmpC z drugorzędowymi przeciwciałami anti-ludzkimi klas: IgA, IgM i IgG skoniugowanymi z fosfatą alkaliczną (AP).

Zastosowana metoda chromatografii powinowactwa pozwoliła na uzyskanie swoistych przeciwciał anti-OmpC, których aktywność potwierdzono w testach

immunoenzymatycznych (Rycina 19 B). Rozdział elektroforetyczny analizowanych przeciwciał, przedstawiony na rycinie 18, ilustruje rozdzielone łańcuchy immunoglobulin o różnych masach w zależności od klasy przeciwciała. Po transferze badanego materiału na membranę Immobilon P i wybarwieniu jej za pomocą barwnika Panceau red, widoczne są 3 wyraźne prążki oznaczone na rycinie 19 A jako ~70 kDa, ~50 kDa (obszar łańcuchów ciężkich) oraz ~25 kDa (obszar łańcuchów lekkich).

Rozdział elektroforetyczny (Rycina 18) uwidoczniał więcej prążków (nieznacznie różniących się pod względem masy) pochodzących od łańcuchów ciężkich, niż obraz po transferze na membranę Immobilon P. Podczas analizy reaktywności uzyskanych swoistych przeciwciał anti-OmpC metodą Western Blot zaobserwowano, że na membranie wyraźnie widoczna jest reaktywność w zakresie mas od ok. 50 do ok. 80 kDa, co uwidacznia łańcuchy ciężkie o niewielkich różnicach masy.

Uzyskany obraz ilustrujący reaktywność poszczególnych łańcuchów przeciwciał wykrywanych przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną klas IgA, IgG oraz IgM, wskazuje na drobne różnice w masach łańcuchów ciężkich. Przeciwciała drugorzędowe pozyskane komercyjnie skierowane są na łańcuch ciężkie przeciwciał ludzkich. Na membranie widoczna jest wyłącznie reaktywność z łańcuchami ciężkimi, gdyż tylko one mogły zostać rozpoznane przez przeciwciała II-go rzędowe.

4.8. Otrzymanie i oczyszczenie rekombinowanego białka OmpC

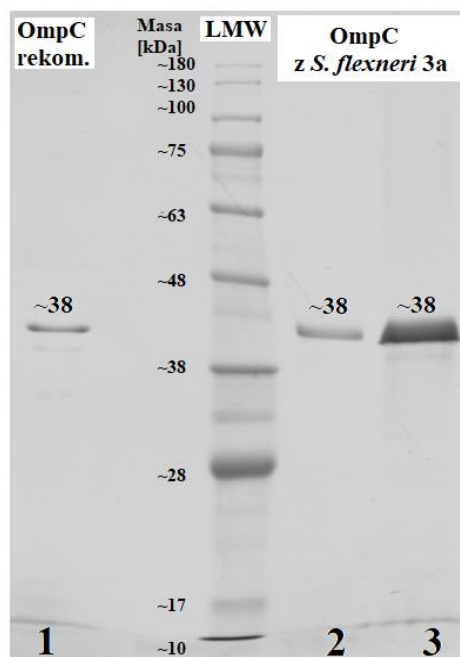
Natywne białko OmpC izolowane z błony zewnętrznej *Shigella flexneri*, ze względu na wysoką swoistość oddziaływań, jest dobrym materiałem do badań immunoreaktywności z surowicą ludzką. Z uwagi jednak na jego wysoką hydrofobowość oraz kilkietapowy proces pozyskiwania, podjęto próbę zastosowania alternatywnych metod otrzymania antygeny prezentującego epitop białka OmpC. I tak obok koniugatów peptydów, zawierających sekwencję aminokwasową białka OmpC odpowiedzialną za wiązanie przeciwciał z nośnikiem jakim jest monomer białka BSA, postanowiono zastosować odpowiednią metodologię celem, uzyskania rekombinowanego białka OmpC.

Insert zawierający gen *OmpC* wklonowano do wektora pQE80L otrzymując konstrukt pQE80L/OmpC. Konstrukt uzyskano dzięki współpracy z dr hab. Anną Dąbrowską z Wydziału Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Konstruktem pQE80L/OmpC transformowano kompetentne bakterie *E. coli* Novablue.

Pałeczki *E. coli* po transformacji wysiano na podłoże różnicujące z ampicyliną, aby wyodrębnić bakterie, które pobrały konstrukt. Następnie przygotowano w temperaturze

37°C całonocną hodowlę płynną na podłożu 2×YT. Otrzymane *inoculum* bakterii wprowadzono w stosunku 1:60 do świeżej porcji podłoża 2×YT i inkubowano w 37°C na wytrząsarce obrotowej (190 rpm), celem uzyskania gęstości optycznej hodowli OD = 0,4.

Następnie, aby zaindukować ekspresję białka rekombinowanego, dodano IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Po inkubacji przez 4 godz. (37°C, na wytrząsarce obrotowej przy 190 rpm) hodowlę wirowano przez 15 min. (7000×g, 4°C). Otrzymany osad poddano lizie w celu izolacji rekombinowanego białka OmpC (Rycina 20).



Rycina 20. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący uzyskany w systemie ekspresyjnym *E. coli* preparat rekombinowanego białka OmpC (ścieżka 1) oraz natywnego białka OmpC pozyskanego z *S. flexneri* 3a (ścieżka 2 i 3).

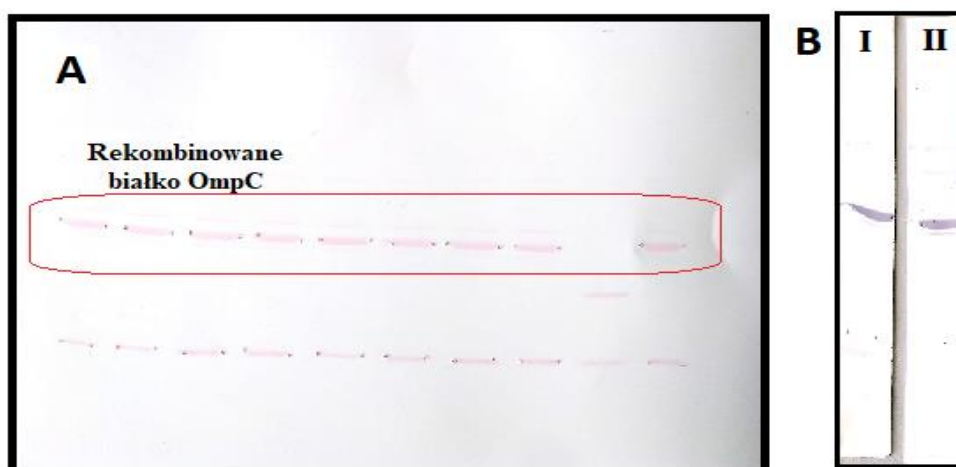
Oceniając metodologię otrzymania preparatu białka rekombinowanego można wysunąć twierdzenie, że ma ona pewną przewagę nad sposobem uzyskania preparatu natywnego białka OmpC na drodze ekstrakcji kwasem walerianowym, przede wszystkim z uwagi na łatwiejszy i szybszy sposób pozyskania preparatu.

Co prawda cała procedura transformacji bakterii *E. coli* jest dłuższa i nieco bardziej skomplikowana niż hodowla pałeczek *S. flexneri* oraz izolacja białka z błony bakterii, to jednak tę procedurę wykonujemy jeden raz, a uzyskanie dużej ilości preparatu białka rekombinowanego nie wymaga powtarzania. Transformowane bakterie, które osiągną wymaganą gęstość optyczną stymulowane są mimetykiem laktozy (IPTG) do produkcji

białka. Otrzymane w ten sposób białko ma znaczną przewagę ilościową nad białkami własnymi bakterii *E. coli*.

Rekombinowane białko odkłada się w cytoplazmie bakterii oraz w niewielkim stopniu wydzielane jest do podłoża hodowlanego. Proces otrzymania homogenego preparatu jest prostszy niż otrzymywanie na drodze ekstrakcji z *Shigella flexneri*. Hodowlę po stymulacji IPTG odwirowuje się, a następnie po dodaniu buforu do lizy poddaje sonikacji ultradźwiękami. Dzięki temu dochodzi do rozerwania błon bakteryjnych i uwolnienia odkładanego w cytoplazmie rekombinowanego białka OmpC.

Immunoreaktywność otrzymanego rekombinowanego białka OmpC z przeciwciałami surowiczymi potwierdzono z wykorzystaniem metody Western Blot. Preparat uzyskany po lizie bakterii po ekspresji białka rozdzielano elektroforetycznie, a następnie białka transferowano na membranę Immobilon P (Rycina 21 A). Następnie membranę z transferowanymi białkami po lizie komórek ekspresjonujących rekombinowane OmpC, poddano badaniu reaktywności metodą Western Blot z surowicami krwi dwóch krwiodawców (Rycina 21 B I i II)



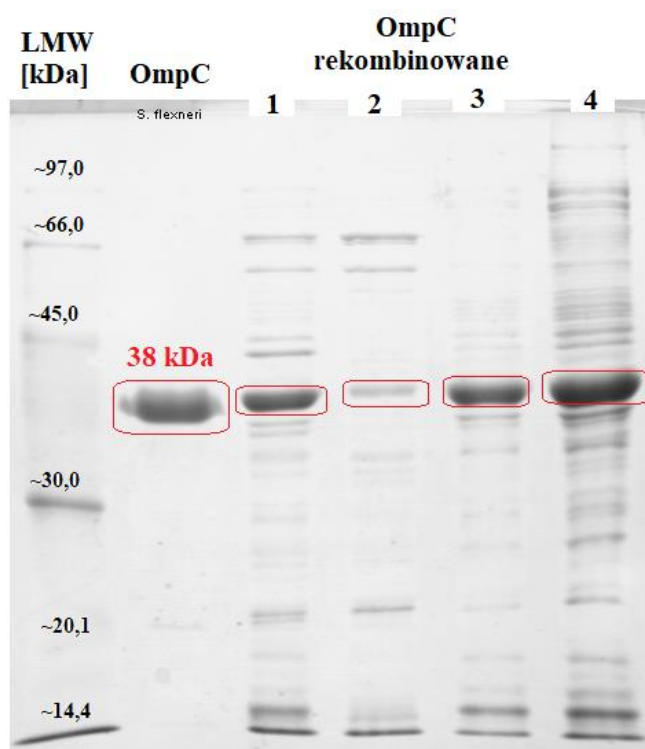
Rycina 21. Rekombinowane białko OmpC po rozdzieleniu elektroforetycznym i transferze na membranę Immobilon P (A) oraz jego reaktywność z surowicami dwóch krwiodawców (B I i B II) w rozcieńczeniu 1:100, oznaczona metodą Western Blot.

Proces separacji rekombinowanego białka OmpC od innych białek własnych *E. coli* oraz innych jej komponentów również jest łatwiejszy do przeprowadzenia niż w przypadku natywnego białka OmpC. Tworząc konstrukt, dodano do jego końca metkę histydynową (His-Tag), która po ekspresji białek ułatwia jego oczyszczenie dzięki wysokiej reaktywności metki His-Tag ze złożem zawierającym jony metali jak kobalt czy nikiel. Jednak uzyskane w systemie ekspresyjnym *E. coli* rekombinowane białko OmpC,

wykazuje wyższą hydrofobowość niż natywne białko OmpC, ekstrahowane z bakterii *Shigella flexneri*.

Niestety, uzyskana rozpuszczalna forma rekombinowanego białka OmpC występowała w buforach jedynie w niewielkim stężeniu (poniżej 0,1 mg/ml). Jego rozpuszczalność próbowano zwiększyć przez wzbogacenie buforu o detergenty czy mocznik (8 M). Preparaty tego białka bez detergentu czy wysokiego stężenia mocznika rozdzielają się przy wirowaniu tworząc osad bogaty w OmpC. W znaczny sposób utrudnia to badanie immunoreaktywności tego białka, a niekiedy całkowicie je uniemożliwia.

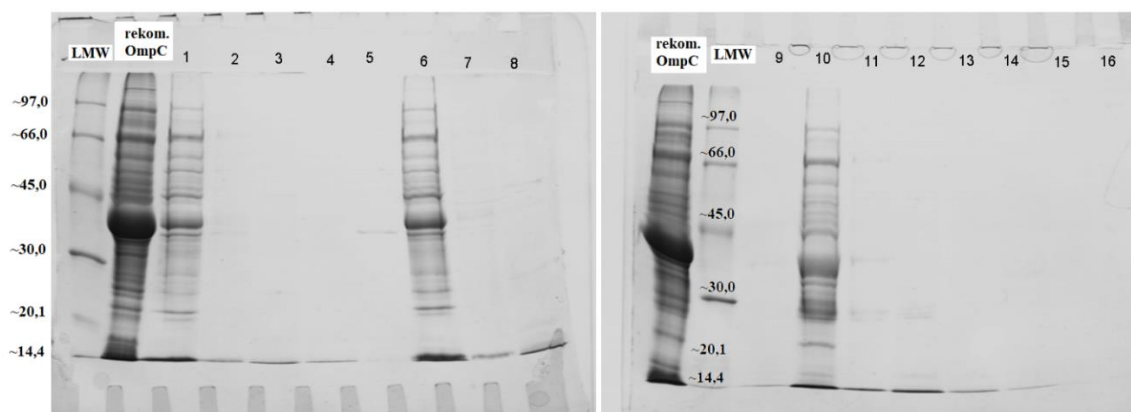
Jak widać na rycinie 20 białko OmpC pozyskane po ekspresji i lizie komórek bakteryjnych widoczne jest jako najintensywniejszy prążek, zawierający największą ilość białka w mieszaninie. Jednak naniesienie na żel poliakrylamidowy większej ilości uzyskanego preparatu rekombinowanego białka OmpC (Rycina 22, ścieżki 1–4), powoduje uwidocznienie się zawartości innych białek.



Rycina 22. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący preparat rekombinowanego białka OmpC w systemie ekspresyjnym *E.coli* (ścieżki 1–4) oraz natywnego białka OmpC pozyskanego z *S. flexneri* 3a.

Pozyskany preparat poddano wirowaniu, a otrzymany supernatant oraz osad poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w celu określenia zawartości białka

rekombinowanego (Rycina 22, supernatant – ścieżka 2, osad – ścieżka 3 i 4). Niestety białko rekombinowane, charakteryzujące się niskim stopniem rozpuszczalności, przeszło do osadu, natomiast w supernatancie było obecne w znacznie niższym stężeniu. Uzyskany po wirowaniu osad zawierał więcej białka rekombinowanego w odniesieniu do innych białek, niż roztwór tego białka przed wirowaniem. Obecność metki His-Tag wykorzystano do podjęcia prób oczyszczania mieszaniny celem uzyskania homogennego preparatu rekombinowanego białka OmpC. Mieszaninę białek naniesiono na kolumnienki ze złożem wiążącym His-Tag (Rycina 23, ścieżka 1), a następnie przepłukiwano buforem płuczącym (wash buffer) w celu usunięcia białek niezwiązanych ze złożem (Rycina 23, ścieżka 2). Białko związane swoiście ze złożem eluowano dwukrotnie (Elution buffer) (Rycina 23, ścieżka 3 i 4), następnie złożo regenerowano przed kolejnym użyciem (X tractor buffer) (Rycina 23, ścieżka 5).



Ścieżki 1, 6 i 10 – preparat białkowy, 2, 7 i 11 – płukanie, 3, 4, 8, 12 i 13 – elucja, 5, 9, 14 – 16 – regeneracja złoża.

Rycina 23. Obraz po rozdiale elektroforetycznym rekombinowanego białka OmpC. Ścieżki oznaczone numerami 1–5 przedstawiają kolejne etapy oczyszczania w buforze bez dodatku detergentu/mocznika, 6–9 w buforze z dodatkiem detergentu (Tween 20) oraz 10–16 w buforze z dodatkiem mocznika.

Próby oczyszczenia białka rekombinowanego prowadzono w buforach bez dodatku detergentu/mocznika oraz z dodatkiem detergentu lub mocznika, które sprzyjały rozpuszczaniu rekombinowanego białka OmpC. Niestety w żadnej z zastosowanych kombinacji nie udało się związać białka do złoża (Rycina 22).

W celu uzyskania rozpuszczalnej i homogennej formy białka rekombinowanego w większej ilości, podjęto próby z zastosowaniem zmian pH oraz poprzez zwiększenie stopnia rozpuszczalności wskutek zawieszenia rekombinowanego OmpC w buforze z

mocznikiem i BSA, a następnie stosując powolne, stopniowe oddializowanie mocznika. Jednak żadna z zastosowanych procedur związanych ze zmianami pH czy próbą tworzenia kompleksów BSA/rek. OmpC, nie skutkowało uzyskaniem większej ilości rozpuszczalnej formy rekombinowanego białka OmpC. Jak wiadomo, do użycia rozpuszczalnego białka w celu przeprowadzenia na szeroką skalę badań immunoreaktywności z surowicami, taka forma preparatu jest niezbędna, podobnie jak do skonstruowania złoża do chromatografii powinowactwa stosowanego do izolacji swoistych przeciwciał anti-OmpC. Stąd też do badań reaktywności z przeciwciałami obecnymi w surowicach ludzkich jako antygeny zastosowano przede wszystkim natywne białko OmpC oraz koniugaty liniowego peptydu z BSA i cyklicznego peptydu z BSA. Natomiast tę niewielką ilość uzyskanej rozpuszczalnej formy rekombinowanego białka OmpC, wykorzystano także do przeprowadzenia doświadczenia modelowego na zwierzętach dotyczącego charakterystyki właściwości ochronnych, w którym antygenami użytymi do immunizacji myszy była natywna lub rekombinowana forma białka OmpC.

4.9. Reaktywność i miana przeciwciał anti-OmpC surowicy ludzkiej z wybranymi antygenami

4.9.1. Oznaczanie miana przeciwciał anti OmpC klasy IgA testem ELISA [51, 132]

Najczęstszymi niedoborami wśród PNO są te związane z nieprawidłowościami w obrębie wytwarzania przeciwciał. Stanowią one ponad połowę wszystkich przypadków niedoborów immunologicznych. Dlatego diagnozowanie niedoborów odporności, a w szczególności niedoborów humoralnych, może być przeprowadzane przy pomocy testów serologicznych. Test serologiczny oparty na wyznaczeniu poziomu przeciwciał u pacjenta pozwoli na szybką ocenę czy ich poziom mieści się w granicach normy.

W celu opracowania takiego testu należy określić normy poziomu przeciwciał w surowicach osób, u których nie stwierdzono niedoborów odporności oraz u pacjentów z potwierdzonym PNO. Różnice w średnim poziomie przeciwciał w surowicach pacjentów w stosunku do poziomu przeciwciał w surowicach grupy kontrolnej, pozwolą określić czy u diagnozowanego pacjenta można podejrzewać humoralne niedobory odporności. Przeprowadzone przez nas badania wykazały reaktywność przeciwciał ludzkiej krwi obwodowej z jednym z białek głównych *S. flexneri* 3a, białkiem OmpC. Kolejne etapy badań pozwoliły określić najkrótszą sekwencję aminokwasów zdolną do efektywnego

wiązania przeciwciał anti-OmpC. Zbadana reaktywność umożliwiła wybór antygenów, które posłużyły do oznaczenia poziomów przeciwciał w surowicach badanych grup.

Białko OmpC, uzyskane z błony zewnętrznej pałeczek *S. flexneri* 3a, wykazuje silne powinowactwo do przeciwciał z surowicy ludzkiej, dlatego zostało użyte do badań jako jeden z antygenów. Błonowe białko OmpC zawiera w swojej strukturze wiele aminokwasów hydrofobowych, które umożliwiają mu oddziaływanie z lipidowym środowiskiem błony. Ma to negatywny wpływ na jego rozpuszczalność w roztworach wodnych. W celu zwiększenia rozpuszczalności takich białek konieczne jest wzbogacenie buforu o np. detergent, a to z kolei negatywnie wpływa na immobilizację białka do powierzchni, a w konsekwencji utrudnia wykonanie testów immunoenzymatycznych z jego wykorzystaniem. Ponadto izolacja białka z błony bakteryjnej, a następnie oczyszczanie go do uzyskania homogennego preparatu jest procesem wieloetapowym i czasochłonnym, co komplikuje pozyskiwanie go i wykorzystanie jako antygeny do testów. Ze względu na to do opracowania testu zaproponowano i przygotowano także inne antygeny, łatwiejsze w otrzymywaniu, których właściwości fizyczne umożliwiają wykorzystanie ich do testów immunosorpcyjnych.

Poza natywnym białkiem OmpC, do badania reaktywności surowicznych przeciwciał anti-OmpC testem ELISA przygotowano dwa koniugaty białkowe na bazie monomeru BSA i peptydów zawierających epitop wiążący białka OmpC (rozdział 3.3). Oba peptydy zawierały sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez ludzkie przeciwciała anti-OmpC, ale różniły się pod względem konformacji przestrzennej. Jeden z peptydów miał strukturę liniową, natomiast drugi cykliczną, co przypomina jego ułożenie w środowisku naturalnym jako pętla zewnątrzłonowa. Za pomocą techniki spektrometrycznej (MALDI-TOF-MS), w odniesieniu do BSA, wyznaczono obsadzenie białka nośnikowego peptydami. Średnio na jedną cząsteczkę BSA przypadły prawie 4 cząsteczki peptydu cyklicznego i prawie 6 cząsteczek peptydu liniowego.

W założeniach doświadczenia kierowano się tym, aby na każdy dołek płytki titracyjnej (jeden dołek odpowiada jednemu niezależnemu pomiarowi) przypadła taka sama liczba epitopów zdolnych do wiązania przeciwciał anti-OmpC. Masa używanych w teście koniugatów była zależna od masy białka OmpC, którego na każdy dołek nanoszono 0,5 µg w 100 µl buforu węglanowego (5 µg/ml). Masa koniugatów, wyznaczona za pomocą MALDI-TOF-MS, cyklicznego i liniowego wynosiła odpowiednio 73,560 i 75,204 kDa (~75 kDa). Schemat obliczania ilości nanoszonych antygenów przedstawiono poniżej.

Masa 1 mola białka OmpC:

$$M_{OmpC} = 38 \text{ kDa} \rightarrow 1M_{OmpC} = 3,8 \times 10^4 \text{ g} \rightarrow 1M_{OmpC} = 3,8 \times 10^{10} \mu\text{g}$$

Z proporcji obliczam ile moli zawiera 0,5 μg OmpC:

$$1M_{OmpC} - 3,8 \times 10^{10} \mu\text{g}$$

$$xM_{OmpC} - 0,5 \mu\text{g}$$

$$x = 1,32 \times 10^{-11} \text{ mola}$$

0,5 μg OmpC zawiera $1,32 \times 10^{-11}$ mola tego białka.

Obliczanie z proporcji masy koniugatów odpowiadającej liczbie moli białka OmpC (przyjęto uśrednioną masę koniugatów: 75 kDa):

$$1 \text{ mol} - 7,5 \times 10^{10} \mu\text{g}$$

$$1,32 \times 10^{-11} \text{ mola}_{\text{koniugatu}} - x \mu\text{g}$$

$$x = 9,9 \times 10^{-1} = 1,0 \mu\text{g}$$

Masa koniugatu jest prawie dwukrotnie większa od masy białka OmpC ($2 \times 38 \text{ kDa} = 76 \text{ kDa}$), co potwierdza uzyskany wynik.

Z uwagi na to, że jedna cząsteczka białka OmpC zawiera jeden epitop wiążący, a cząsteczka koniugatu cyklicznego zawiera 4 epitopy, masę tego koniugatu, nanoszoną na jeden dołek płytki titracyjnej, należy podzielić przez 4:

$$1,0 \mu\text{g} : 4 = 0,25 \mu\text{g}$$

Obsadzenie białka nośnikowego peptydem liniowym wynosi 6, dlatego:

$$1,0 \mu\text{g} : 6 = 0,167 \mu\text{g}$$

Masa koniugatów odpowiadająca liczbie epitopów wiążących zawartych w 0,5 μg (5,0 $\mu\text{g/ml}$) białka OmpC wynosi 0,25 μg koniugatu cyklicznego (2,5 $\mu\text{g/ml}$) i 0,167 μg koniugatu liniowego (1,67 $\mu\text{g/ml}$).

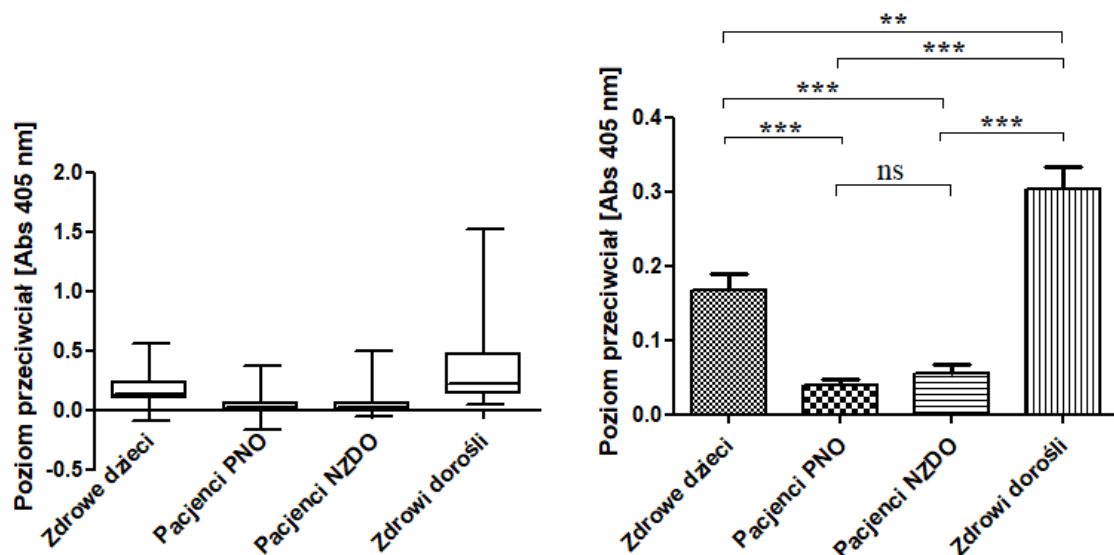
Pierwotnie zakładano, że jako czwarty antygen do oznaczania miana przeciwciał anti-OmpC w surowicach badanych grup, zostanie użyte uzyskane rekombinowane białko OmpC, wyprodukowane w systemie ekspresyjnym *E. coli* (rozdział 3.13.). Niestety ze względu na niski poziom rozpuszczalności uzyskanego białka w roztworach wodnych

nie został on wykorzystany jako antygen w teście ELISA. Oznaczono poziom swoistych przeciwciał klasy IgA w surowicach dzieci ze zdiagnozowanymi pierwotnymi niedoborami immunologicznymi, dzieci z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych, dzieci zdrowych oraz zdrowych dorosłych.

Miano przeciwciał oznaczano przy zastosowaniu rozcieńczenia surowicy 1:250 (IgA) lub 1:750 (IgG) dla 3 badanych antygenów natywnego białka OmpC oraz dwóch koniugatów: BSA-peptyd liniowy o sekwencji GLNRYDERYIGC oraz BSA-peptyd cykliczny o sekwencji GGLNRYDERYIGC. Białko OmpC użyto w stężeniu 5 µg/ml, koniugat BSA/ peptyd linowy w stężeniu 1,67 µg/ml, a koniugat BSA-peptyd cykliczny w stężeniu 2,5 µg/ml.

W celu wykluczenia niespecyficznego oddziaływania komponentów surowicy, jako kontrolę dla każdej surowicy przygotowano dołek na płycie titracyjnej, do którego opłaszczenia nie użyto żadnego antygeny. Następnie wszystkie próby (dołki) na płycie titracyjnej zablokowano stosując 1% BSA. Blokowanie białkiem BSA pozwoliło dodatkowo wykluczyć niespecyficzne oddziaływania między białkami surowicy, a białkiem nośnikowym (BSA) użytym do otrzymania koniugatów. Szczególnie wysoki poziom oddziaływań niespecyficznego uzyskano dla pacjentów z ogólnym stanem zapalnym (wysoki poziom CRP) [34, 80].

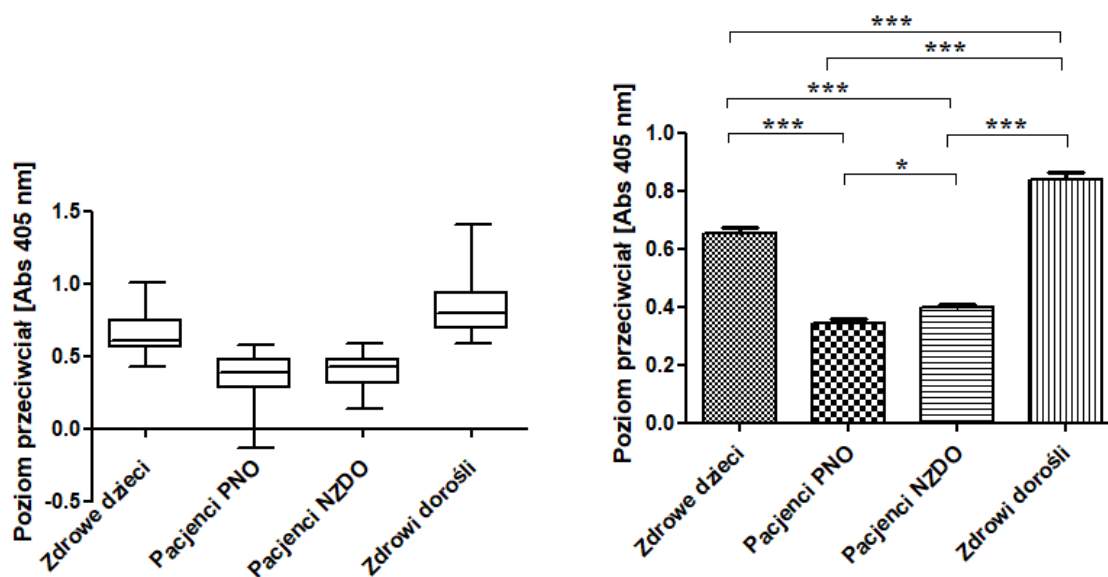
Poniżej zamieszczono analizę statystyczną przedstawiającą uśrednione miano przeciwciał anty-OmpC klasy IgA w surowicach w poszczególnych grupach badanych i kontrolnych (Rycina 24–26).



Rycina 24. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA anty-OmpC oznaczone w badanych grupach pacjentów i grupach kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

IgA	Poziom istotności statystycznej miana przeciwciał klasy IgA anty-OmpC			
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	pacjenci z NZDO	zdrawi dorośli
zdrowe dzieci	–	–	–	–
pacjenci z PNO	$P < 0,0001$ ***	–	–	–
pacjenci z NZDO	$P < 0,0001$ ***	$P = 0,2398$	–	–
zdrawi dorośli	$P = 0,0020$ **	$P < 0,0001$ ***	$P < 0,0001$ ***	–

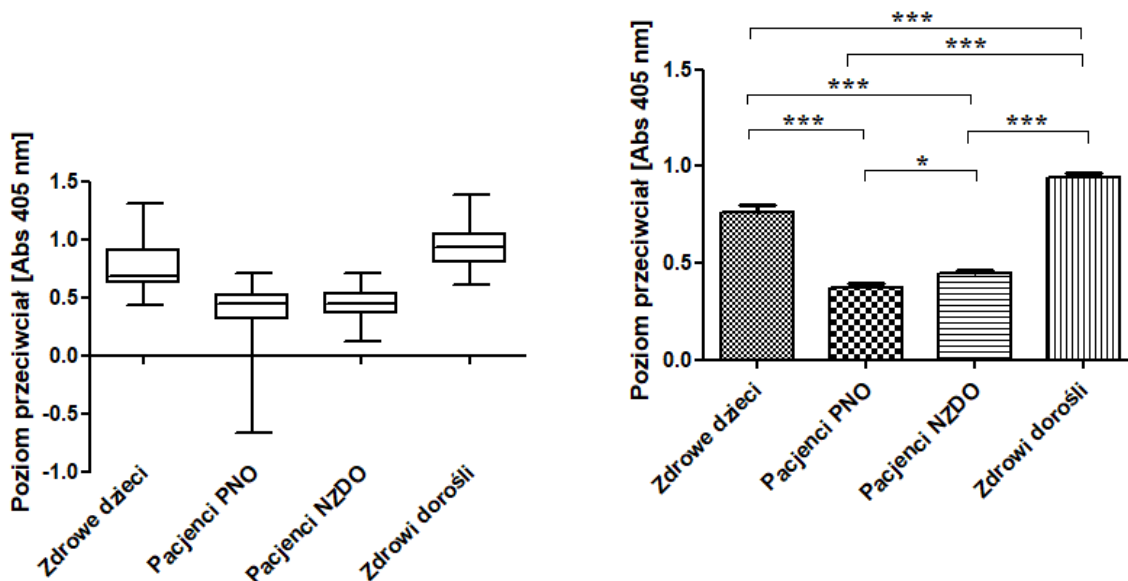
Tabela 12. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał anty-OmpC klasy IgA oznaczonych w surowicach badanych grup.



Rycina 25. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA anty-koniugat cykliczny-BSA, oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

IgA	Poziom istotności statystycznej miana przeciwciał klasy IgA anty- koniugat cykliczny-BSA			
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	pacjenci z NZDO	zdrowi dorośli
zdrowe dzieci	–	–	–	–
pacjenci z PNO	P < 0,0001 ***	–	–	–
pacjenci z NZDO	P < 0,0001 ***	P = 0,0149 *	–	–
zdrowi dorośli	P < 0,0001 ***	P < 0,0001 ***	P < 0,0001 ***	–

Tabela 13. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgA anty-koniugat cykliczny-BSA oznaczonych w surowicach badanych grup.



Rycina 26. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA anty-koniugat liniowy-BSA, oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

IgA	Poziom istotności statystycznej miana przeciwciał klasy IgA anty-koniugat liniowy-BSA			
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	pacjenci z NZDO	zdrowi dorośli
zdrowe dzieci	–	–	–	–
pacjenci z PNO	$P < 0,0001$ ***	–	–	–
pacjenci z NZDO	$P < 0,0001$ ***	$P = 0,0163$ *	–	–
zdrowi dorośli	$P < 0,0001$ ***	$P < 0,0001$ ***	$P < 0,0001$ ***	–

Tabela 14. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgA anty-koniugat liniowy-BSA, wyznaczonych w surowicach badanych grup.

grupa badana	liczba badanych	wiek badanych [lata] ± SD	IgA anty-OmpC ± SD	IgA anty-kon. cykl.-BSA ± SD	IgA anty-kon. lin.-BSA ± SD
zdrowe dzieci	40	10,6 ± 4,1	0,1668 ± 0,0218	0,6523 ± 0,0222	0,7659 ± 0,0319
pacjenci z PNO	127	5,7 ± 4,4	0,0393 ± 0,0077	0,3455 ± 0,0151	0,3693 ± 0,0236
pacjenci z NZDO	83		0,0551 ± 0,0118	0,3967 ± 0,0115	0,4449 ± 0,0139
zdrowi dorośli	66	30,2 ± 12,4	0,3029 ± 0,0306	0,8403 ± 0,0215	0,9437 ± 0,0230

SD – standard deviation (odchylenie standardowe)

Tabela 15. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA, oznaczone w teście ELISA wobec trzech antygenów (białko OmpC, koniugat cykliczny-BSA, koniugat liniowy-BSA), i obecne w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych.

Odporność swoistą nabywamy po kontakcie z patogenami, a dokładniej z antygenami na ich powierzchni. Pałeczki *Shigella* na powierzchni swojej błony komórkowej posiadają wiele białek, w tym białko OmpC. Inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* mają homologiczne białka na powierzchni swojej błony, które ze względu na bliskie pokrewieństwo ewolucyjne mają podobną strukturę pierwszorzędową. Podobieństwo strukturalne tych białek sprawia, że przeciwciała skierowane na innych przedstawicieli enterobakterii mogą również rozpoznawać pałeczki *Shigella*. Taka reaktywność krzyżowa zwiększa skuteczność działania naszego układu odpornościowego. Przeciwciała anty-OmpC występują u wielu osób, nawet u małych dzieci i noworodków, pomimo że nie miały one jeszcze kontaktu z patogenem. Ich obecność wynika z przekazywania tych przeciwciał od matki przez łożysko podczas ciąży, co potwierdziła ich obecność w krwi pępowinowej. Miano tych przeciwciał w pierwszych miesiącach życia dziecka spada aż do czasu, w którym jego układ odpornościowy staje się zdolny do wytwarzania własnych przeciwciał w czasie kontaktu z patogenem.

Niestety u niektórych dzieci nie dochodzi do wytwarzania przeciwciał lub przeciwciała przez nie wytwarzane nie są zdolne do ochrony przed rozwojem infekcji. Takie zaburzenia są często objawem humoralnych niedoborów odpornościowych, które

stanowią 50–60% wszystkich pierwotnych niedoborów odporności i predysponują pacjenta do nawracających infekcji o ciężkim przebiegu. Część pacjentów z takimi dysfunkcjami jest niezdolna do produkcji wszystkich przeciwciał lub przeciwciał poszczególnych klas lub podklas (CSR, CVID). Część pacjentów z niedoborami humoralnymi nie wytwarza przeciwciał skierowanych tylko na konkretny patogen – zaburzenia syntezy swoistych przeciwciał (SAD).

Opracowanie testu do diagnostyki humoralnych PNO, opierającego się na detekcji przeciwciał z użyciem białka bakteryjnego jako antygeny, stwarza szansę na szybkie zdiagnozowanie niedoborów odporności, których nie można rozpoznać obecnie dostępnymi metodami opartymi na wyznaczaniu miana poszczególnych klas i podklas przeciwciał. W przypadku SAD miano przeciwciał każdej klasy może znajdować się w granicach normy, a jednak przeciwciała swoiste względem danego patogenu lub grupy patogenów mogą pozostawać poniżej poziomu detekcji. Test serologiczny oparty na oznaczaniu miana przeciwciał anti-OmpC z *S. flexneri* i odniesieniu go do wyznaczonych norm, da nie tylko informację czy pacjent wykazuje zaburzenia w produkcji swoistych przeciwciał anti-OmpC, ale również może sugerować niedobór całych klas immunoglobulin.

Stosując w teście ELISA takie antygeny jak: natywne białko OmpC z pętlą nr 3 zawierającą pełną sekwencję epitopu wiążącego przeciwciała oraz koniugaty cyklicznego peptydu GGLNRYDERYIGC z BSA i liniowego peptydu GLNRYDERYIGC z BSA, uzyskano wyniki ilustrujące różnice w średnich poziomach przeciwciał klasy IgA, obecnych w surowicach badanych grup (pacjenci, kontrola) skierowanych przeciw różnym formom epitopu białka OmpC (Rycina 24–26). Przedstawione ryciny zawierają wykresy pudełkowe (box-plot – po lewej) oraz wykresy słupkowe (po prawej). Jak opisano na początku tego podrozdziału wszystkie antygeny były nanoszone w takiej ilości, aby na każdy dołek płytki titracyjnej (jeden dołek reprezentuje niezależną próbę badawczą) przypadła taka sama liczba epitopów wiążących, co ułatwia analizowanie uzyskanych wyników. Takie dobranie ilości antygenów pozwoliło, nie tylko pokazać różnicę w mianie surowicznych przeciwciał anti-OmpC między różnymi grupami badanych, ale również dostarczyło informacji na temat, który z zastosowanych antygenów jest zdolny do wychwytywania największej ilości przeciwciał. Zgodnie z wcześniejszymi założeniami, każdy z użytych w teście ELISA antygenów pozwolił na zauważenie różnic w mianach przeciwciał anti-OmpC klasy IgA w badanych grupach surowic.

Najwyższe średnie miano przeciwciał anti-**RYDERY** (najkrótsza sekwencja epitopu aktywnie wiążąca swoiste przeciwciała) w surowicach mają krwiodawcy (zdrowi dorośli), nieco niższe dzieci bez stwierdzonych zaburzeń odporności, a najniższy poziom zaobserwowano wśród dzieci z rozpoznaniem PNO/NZDO. Wyniki te potwierdzają również wcześniejsze badania wstępne opublikowane przez nasz zespół w FEMS 2006 [132], gdzie na mniejszej populacji badanych pacjentów do oznaczania miana przeciwciał użyto tylko jednego antygeny – białka OmpC.

Zgodnie z uzyskanymi rezultatami zamieszczonymi w tabeli 15 stwierdzono, że najwyższą reaktywność ze swoistymi przeciwciałami surowiczymi otrzymano w przypadku użycia w teście ELISA jako antygeny koniugatu liniowego z BSA (średnia dla surowic dzieci zdrowych: $0,7659 \pm 0,0319$, dla surowic dzieci z PNO: $0,3992 \pm 0,0155$, dla surowic krwiodawców: $0,9437 \pm 0,0230$). Nieco niższą reaktywność stwierdzono w przypadku zastosowania, jako antygeny, w teście ELISA koniugatu cyklicznego z BSA: (średnia dla surowic dzieci zdrowych: $0,6523 \pm 0,0222$, dla surowic dzieci z PNO: $0,3657 \pm 0,0103$, dla surowic krwiodawców: $0,8403 \pm 0,0215$). Najniższą reaktywność stwierdzono w przypadku zastosowania jako antygeny białka OmpC (średnia dla surowic dzieci zdrowych: $0,1668 \pm 0,0218$, dla surowic dzieci z PNO $0,04552 \pm 0,0066$, dla surowic krwiodawców $0,3029 \pm 0,0306$) (Tabela 15). Poziom istotności statystycznej przedstawiono w tabelach 12–14.

Poziom istotności statystycznej jest jednym z podstawowych aspektów analizy danych. Jest to punkt odcięcia określający prawdopodobieństwo, że otrzymany wynik wystąpił w próbie przypadkowo czyli, że hipoteza zerowa, zdefiniowana jako brak różnic między badanymi grupami, została błędnie odrzucona (błąd I rodzaju). Wartość poziomu istotności statystycznej (α) nie jest narzucona, ale zazwyczaj przyjmuje się wartość $\alpha = 0,05$. Oznacza to przyjęcie ryzyka na poziomie 5%, że wykazane różnice w rzeczywistości nie występują.

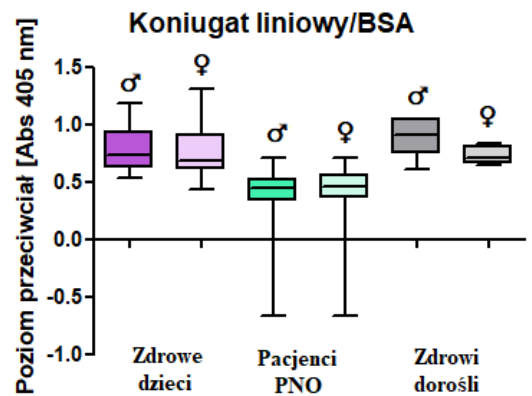
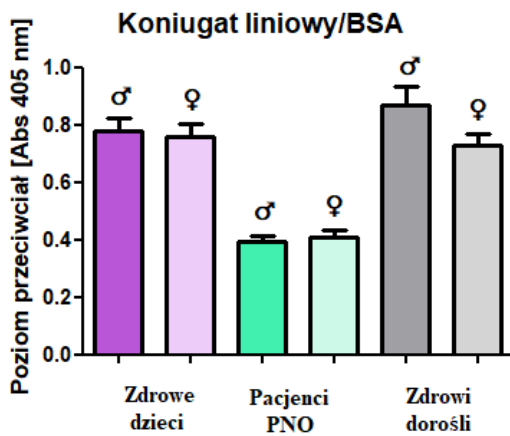
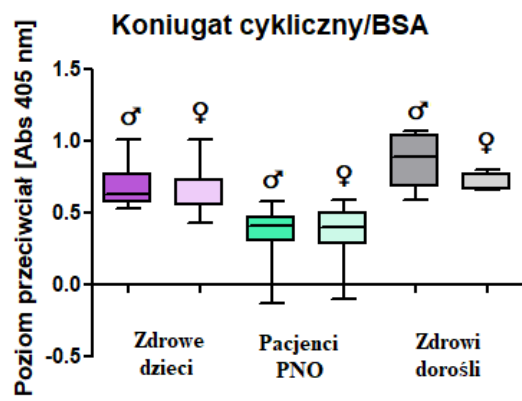
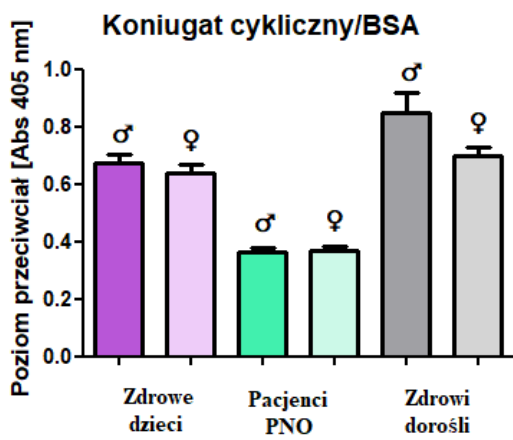
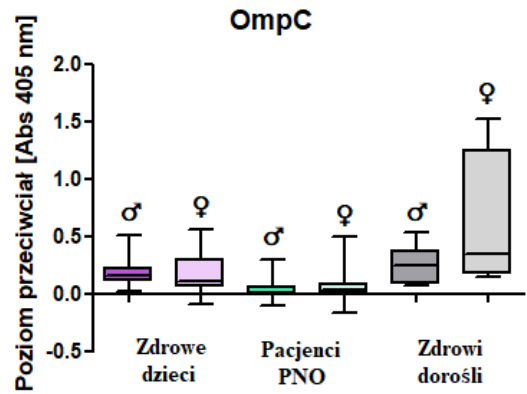
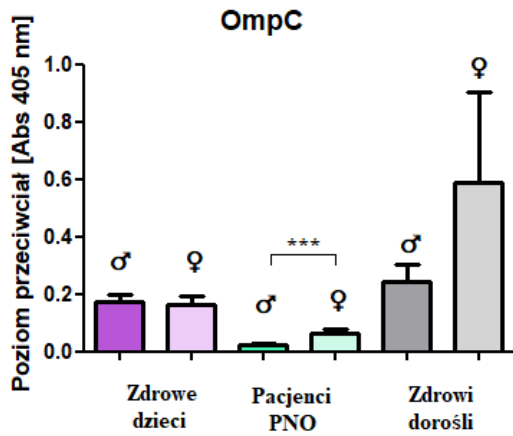
Poziom istotności statystycznej weryfikowany jest przez wykonanie testu istotności statystycznej, której wynikiem jest wartość P (P-value). Wartość P porównuje się do przyjętej wartości poziomu istotności (α). Jeśli $P \leq \alpha$ możemy odrzucić hipotezę zerową, która zakładała brak różnic w uśrednionym poziomie przeciwciał w badanych grupach. W analizie danych przyjęto trzy wartości α świadczące o poziomie istotności statystycznej 0,05, 0,01 oraz 0,001 oznaczane na rycinach/tabelach symbolami „*”, „**”. Wartość $P \leq 0,05$ *, $P \leq 0,01$ ** oraz $P \leq 0,001$ ***.

Uzyskane różnice w reaktywności mogą wynikać z wielu powodów, jednak najbardziej oczywiste wydają się różnice wynikające z ekspozycji epitopów. Białko OmpC ma tylko jeden epitop wiążący w swojej strukturze i podczas immobilizacji tego białka do powierzchni płytki

titracyjnej epitop może być niedostępny dla przeciwciał, co powoduje niski uzyskany sygnał reaktywności.

Koniugaty z BSA: cykliczny i liniowy zawierają na swojej powierzchni po kilka epitopów, dlatego w każdym ułożeniu koniugatu część epitopów jest odpowiednio eksponowana i dostępna dla przeciwciał. Tłumaczy to znacznie wyższą reaktywność obu koniugatów w porównaniu do białka OmpC. Średnie obsadzenie monomeru BSA peptydami liniowymi wynosi ok. 4, natomiast cyklicznymi ok. 6, przez co koniugat liniowy wykazał większą dostępność epitopów a tym samym wyższą reaktywność. Obydwa koniugaty wykazały wysoką reaktywność z surowicami, co sugeruje, że ułożenie przestrzenne epitopu (cykliczne/liniowe) nie wpływa znacząco na powinowactwo do przeciwciał.

Test diagnostyczny powinien uwzględniać różne czynniki, które mogą mieć wpływ na miano przeciwciał anty-OmpC w surowicy ludzkiej. Postanowiono zatem uzyskane wyniki przeanalizować statystycznie pod kątem płci osób badanych, od których uzyskano surowice. Wielu badaczy zajmujących się tą tematyką wskazuje że, poziom przeciwciał może być różny u kobiet i mężczyzn [45, 116, 136]. Na Rycinie 27 przedstawiono wykresy box-plot oraz wykresy słupkowe dotyczące analizy miana przeciwciał anty-OmpC w surowicach w zależności od płci badanych osób.



Rycina 27. Analiza porównawcza miana swoistych przeciwciał klasy IgA w surowicach kobiet (♀) i mężczyzn (♂) w zależności od antygeny (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA) użytego do testu ELISA.

grupa badana	pleć badanych	liczba badanych	IgA anty-OmpC ± SD	IgA anty-kon. cykl.-BSA ± SD	IgA anty-kon. lin.-BSA ± SD
zdrowe dzieci	M	17	0,1732 ± 0,0266	0,6732 ± 0,0311	0,7760 ± 0,0461
	K	23	0,1621 ± 0,0329	0,6368 ± 0,0313	0,7584 ± 0,0446
pacjenci z PNO	M	117	0,0247 ± 0,0058	0,3635 ± 0,0137	0,3924 ± 0,0205
	K	81	0,0658 ± 0,0119	0,3679 ± 0,0175	0,4071 ± 0,0267
zdrowi dorośli	M	7	0,2429 ± 0,0617	0,8467 ± 0,0696	0,8699 ± 0,0618
	K	4	0,5873 ± 0,3153	0,6968 ± 0,0327	0,7265 ± 0,0419

SD – standard deviation (odchylenie standardowe)

Tabela 16. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgA, oznaczone w surowicach badanych grup wobec trzech użytych w teście ELISA antygenów (białko OmpC, koniugat cykliczny-BSA, koniugat liniowy-BSA) zanalizowane z uwzględnieniem podziału na płeć.

IgA	anty-OmpC			anty-kon. cykl.-BSA			anty-kon. lin.-BSA		
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	zdrowi dorośli	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	zdrowi dorośli	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	zdrowi dorośli
kobiety/ mężczyźni	0,8056	0,0008 ***	0,1900	0,4250	0,8397	0,1569	0,7894	0,6558	0,1414

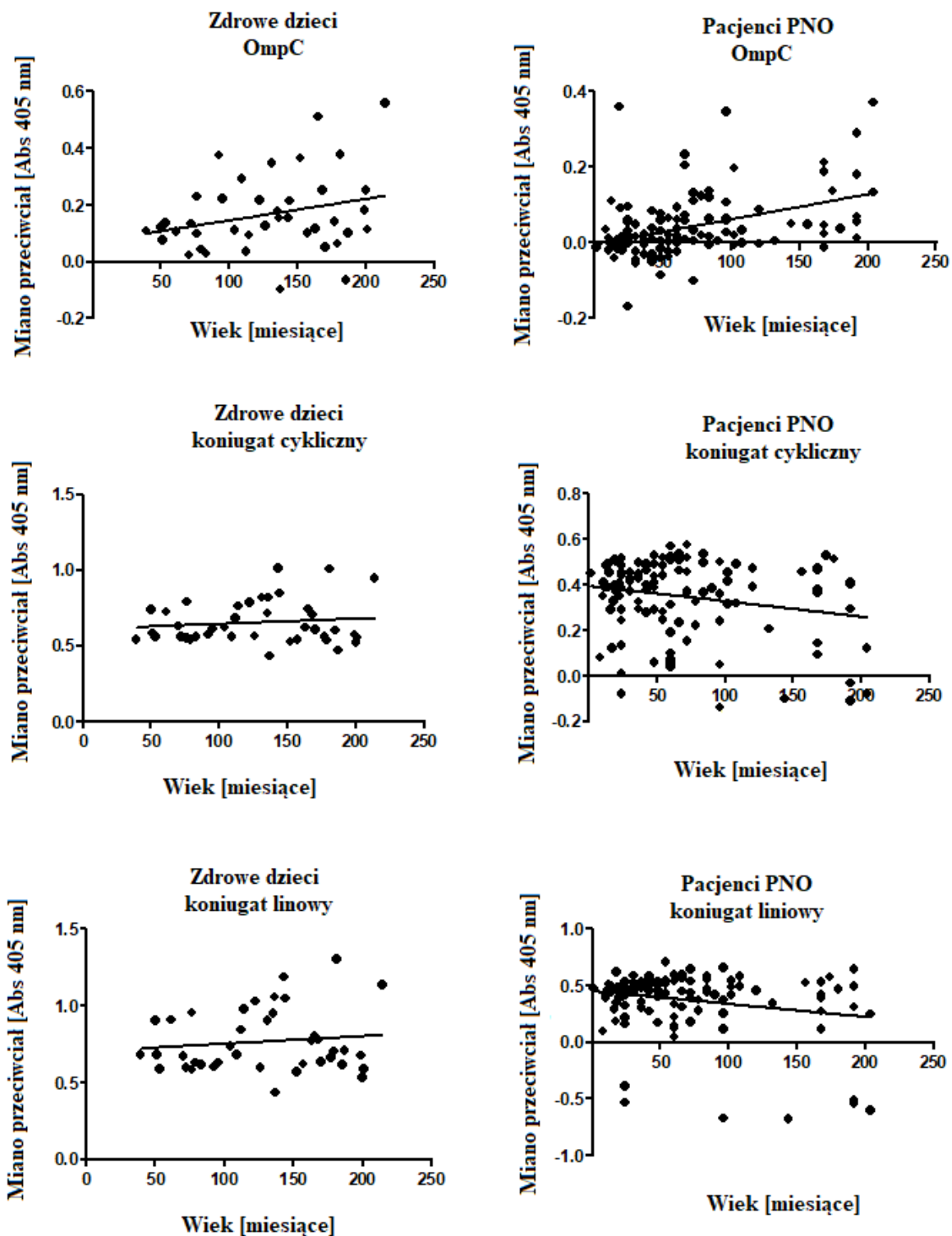
Tabela 17. Przedstawienie wartości P świadczącej o istotności statystycznej. Wynik $P < 0,05$ jest wynikiem istotnym statystycznie ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Największe różnice dotyczące poziomu swoistych przeciwciał w surowicach badanych, możemy zaobserwować w grupie dorosłych krwiodawców. Jednak ze względu na ograniczony materiał kliniczny (mało liczna grupa badanych) nie możemy jednoznacznie stwierdzić, czy różnice zależne są od płci czy wynikają raczej z indywidualnych różnic między badanymi (Rycina 27) (Tabela 16). W pozostałych grupach (dzieci zdrowe oraz pacjenci z PNO) statystycznie istotne różnice w poziomie przeciwciał uzyskano tylko dla kobiet i mężczyzn z grupy pacjentów z niedoborami odporności wyznaczanymi dla antygenu OmpC (Tabela 17).

Z analizy powyższych danych można wnioskować, że poziom swoistych przeciwciał anty-OmpC klasy IgA oznaczony w surowicach badanych, nie jest skorelowany z płcią.

Jak wspomniano wcześniej, aby test diagnostyczny był wiarygodny, to przy jego opracowaniu należy wziąć pod uwagę różne czynniki, które mogą mieć wpływ na miano przeciwciał. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie biorąc pod uwagę również miano przeciwciał klasy IgA i wiek badanych (Rycina 28).

Jak wiadomo, w pierwszych miesiącach życia dziecka, ma ono przeciwciała przekazane od matki. Ich poziom maleje z upływem czasu, natomiast wzrasta poziom przeciwciał wytwarzanych przez organizm dziecka.



Rycina 28. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgA, oznaczone w teście ELISA wobec trzech antygenów (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA) obecne w surowicach badanych grup w zależności od wieku.

IgA	liczba badanych	antygen użyty do testu	współczynnik r-Pearsona	wartość P (poziom istotności statystycznej)
zdrowe dzieci	40	białko OmpC	0,273	0,088
		koniugat cykliczny z BSA	0,120	0,463
		koniugat liniowy z BSA	0,121	0,458
pacjenci z PNO	119	białko OmpC	0,416	< 0,001 ***
		koniugat cykliczny z BSA	-0,212	0,021 *
		koniugat liniowy z BSA	-0,224	0,014 *

Tabela 18. Przedstawienie wartości współczynników korelacji r-Pearsona z analizy zależności miana swoistych przeciwciał klasy IgA od wieku zdrowych dzieci lub pacjentów PNO (korelacja słaba r od -0,5 do 0,0 oraz 0,0 do 0,5, korelacja silna r od -1,0 do -0,5 oraz od 0,5 do 1,0). Wartość P < 0,05 świadczy o istotności statystycznej (P < 0,05*, P < 0,01, P < 0,001***).**

Współczynnik korelacji r-Pearsona pozwala na określenie, czy istnieje związek liniowy między dwoma zmiennymi – jeśli tak, to pozwala określić jaka jest jego siła oraz jaki ma on charakter tj. czy jest dodatni (korelacja pozytywna) czy ujemny (korelacja negatywna). Analiza korelacji r-Pearsona dla oznaczonego poziomu swoistych przeciwciał klasy IgA w surowicach zdrowych dzieci, wskazuje na tendencję wzrostową miana przeciwciał wraz z wiekiem dziecka (Tabela 18). Jednak wartości współczynnika korelacji r mniejsze od 0,5 wskazują na słabą korelację. Poziom istotności statystycznej dla dzieci zdrowych jest większy od 0,05, co nie pozwala na odrzucenie hipotezy zerowej (H_0 – miano przeciwciał u dzieci nie zależy od ich wieku).

Uzyskane dla surowic dzieci zdrowych wyniki nie pokazują silnej zależności między poziomem przeciwciał anti-OmpC z *S. flexneri* 3a klasy IgA. Do analizy nie włączono pacjentów powyżej 18 r.ż. ze względu na brak szczegółowych danych na temat ich wieku. Wśród uzyskanych wyników miana swoistych przeciwciał w surowicach dzieci zdrowych (bez niedoborów immunologicznych) są rezultaty dotyczące surowic pochodzących od dzieci powyżej 3 r.ż., dlatego też nie zaobserwowano początkowego

spadku mian przeciwciał przekazanych przez łożysko od matki. Spodziewany początkowy spadek miana przeciwciał wśród dzieci do 3 r.ż. wynika ze stopniowej utraty przeciwciał przekazywanych dzieciom przez łożysko od matki.

Oznaczone miano przeciwciał klasy IgA w surowicach pacjentów z PNO wyznaczone względem bakteryjnego białka OmpC wskazuje na wzrost jego poziomu wraz z wiekiem dzieci. Współczynnik korelacji r-Pearsona wynosi 0,416 ($r < 0,5$) co świadczy o niskiej korelacji, jednak $p < 0,001$ wskazuje na wysoką istotność statystyczną uzyskanego wyniku. Dla poziomu swoistych przeciwciał w surowicach pacjentów z PNO wyznaczonych wobec koniugatów cyklicznego oraz liniowego z BSA, otrzymano wyniki ujemne na poziomie kolejno -0,212 oraz -0,224. Wyniki te sugerują spadek wraz z wiekiem miana przeciwciał anti-OmpC z *S. flexneri* w surowicach dzieci z niedoborami odporności. Wartości P wynoszą w przypadku zastosowania jako antygeny koniugatu cyklicznego z BSA odpowiednio 0,021, a wobec koniugatu liniowego z BSA 0,014 ($P < 0,05$), co pozwala na odrzucenie hipotezy zerowej (H_0 – miano przeciwciał u dzieci nie zależy od wieku).

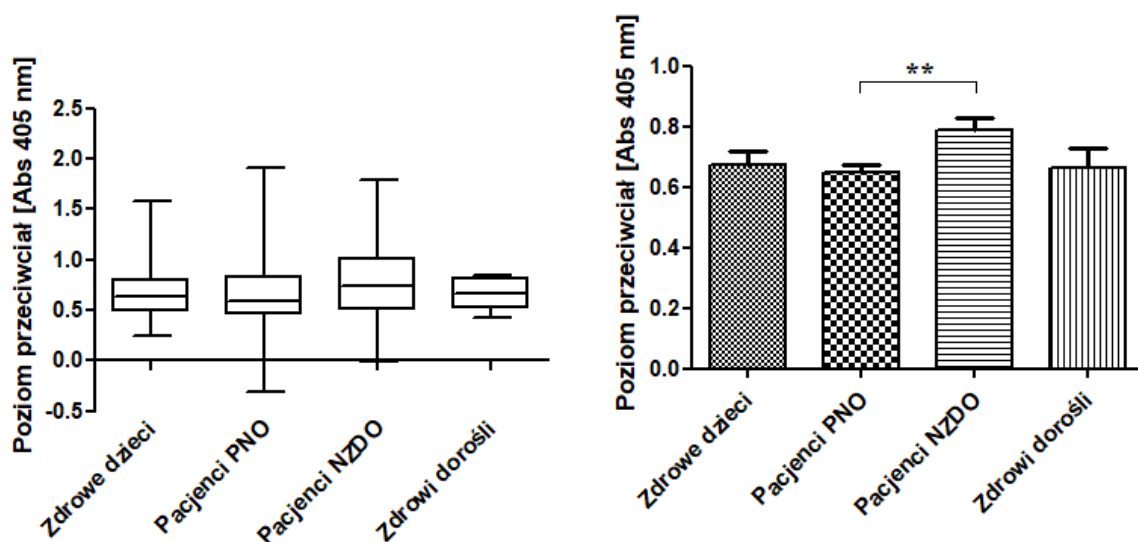
4.9.2. Oznaczanie miana przeciwciał klasy IgG testem ELISA [51, 132]

Przeciwciała klasy IgG są elementem tzw. pamięci długotrwałej, tzn. ich poziom utrzymuje się we krwi przez wiele lat (przeciwnie do przeciwciał klasy IgM – przeciwciała pamięci krótkotrwałej, które pojawiają się znacznie szybciej niż IgG, ale z czasem ich miano spada, natomiast wzrasta poziom przeciwciał klasy IgG). Obecność tych przeciwciał świadczy o kontakcie pacjenta z określonym patogenem. Pacjenci z humoralnymi niedoborami odporności, często nie produkują tej klasy przeciwciał (lub jej podklas), albo przeciwciała te są niefunkcjonalne, podobnie jak przeciwciała klasy IgA. Tacy pacjenci są narażeni na znaczne częstsze infekcje o charakterze nawracającym, a ich przebieg jest znacznie cięższy niż u pacjentów bez obciążeń immunologicznych. Wyznaczanie i porównanie miana przeciwciał tej klasy u pacjentów z PNO oraz pacjentów bez niedoborów odporności, jest niezbędne dla opracowania testu serologicznego do oznaczania niedoborów.

Test ELISA przeprowadzono wg. metody 3.10.2. Oznaczono poziom swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicach dzieci ze zdiagnozowanymi pierwotnymi niedoborami immunologicznymi i dzieci z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych, dzieci zdrowych oraz zdrowych dorosłych. Miana przeciwciał oznaczono stosując rozcieńczenie surowicy 1:750 dla 3 badanych antygenów, białka OmpC oraz dwóch koniugatów, peptyd liniowy o sekwencji GLNRYDERYIGC z BSA oraz peptyd cykliczny o sekwencji

(GGLNRYDERYIGK)C z BSA. Białko OmpC używano w stężeniu 5 µg/ml, natomiast koniugaty użyto w stężeniu odpowiadającym liczbie epitopów wiążących w białku OmpC, koniugat BSA-peptyd liniowy 1,67 µg/ml oraz koniugat BSA-peptyd cykliczny 2,5 µg/ml.

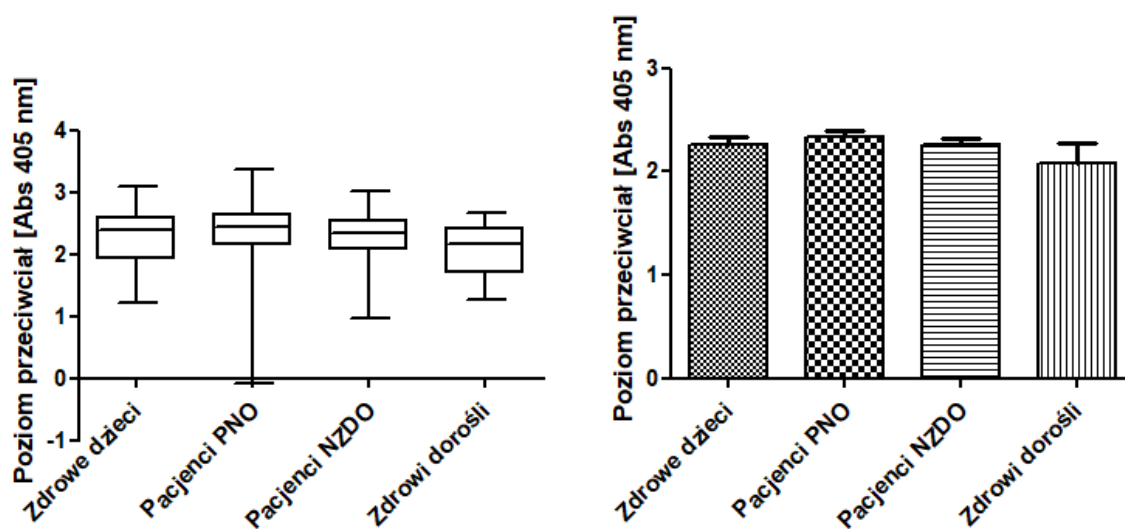
Poniżej (Ryc. 29–31) przedstawiono uśrednione miana poziomów przeciwciał klasy IgG w surowicach badanych grup, określone dla trzech antygenów użytych w teście ELISA (OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA).



Rycina 29. Uśrednione miana przeciwciał anty-OmpC klasy IgG oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

IgG	Poziom istotności statystycznej miana przeciwciał anty-OmpC klasy IgG			
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	pacjenci z NZDO	zdrowi dorośli
zdrowe dzieci	–	–	–	–
pacjenci z PNO	P = 0,6692	–	–	–
pacjenci z NZDO	P = 0,0907	P = 0,0038 **	–	–
zdrowi dorośli	P = 0,9377	P = 0,9077	P = 0,3992	–

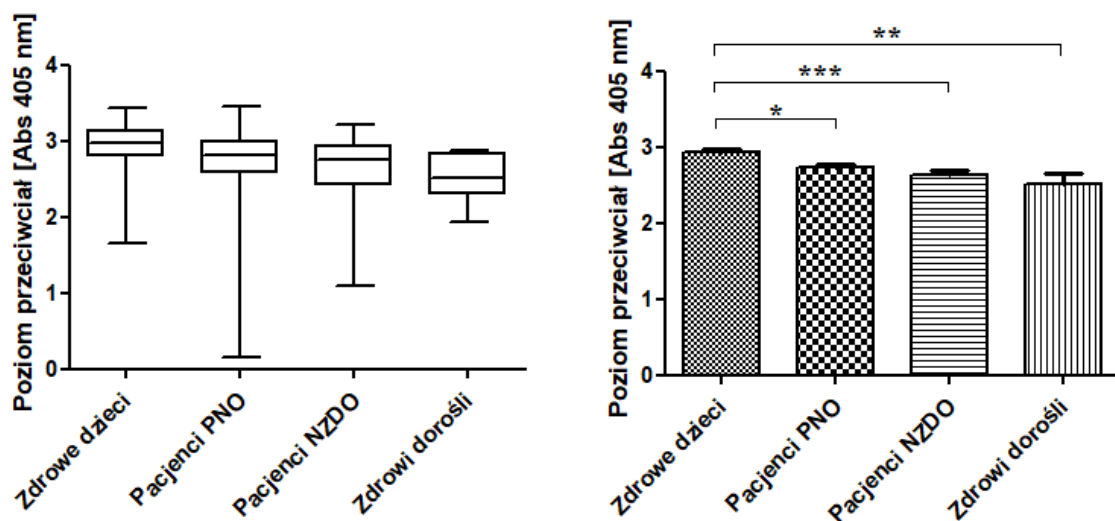
Tabela 19. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian swoistych przeciwciał anti- OmpC klasy IgG oznaczonych między badanymi grupami.



Rycina 30. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgG anty-koniugat cykliczny-BSA, oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

IgG	Poziom istotności statystycznej miana przeciwciał klasy IgG anty-koniugat cykliczny-BSA			
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	pacjenci z NZDO	zdrowi dorośli
zdrowe dzieci	-	-	-	-
pacjenci z PNO	P = 0,4474	-	-	-
pacjenci z NZDO	P = 0,9783	P = 0,3014	-	-
zdrowi dorośli	P = 0,3581	P = 0,2431	P = 0,3360	-

Tabela 20. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgG anty-koniugat cykliczny-BSA oznaczonych w surowicach badanych grup.



Rycina 31. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgG anty-koniugat liniowy/BSA oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

IgG	Poziom istotności statystycznej miana przeciwciał klasy IgG anty-koniugat liniowy-BSA			
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	pacjenci z NZDO	zdrowi dorośli
zdrowe dzieci	–	–	–	–
pacjenci z PNO	P = 0,0244 *	–	–	–
pacjenci z NZDO	P = 0,0004 ***	P = 0,1954	–	–
zdrowi dorośli	P = 0,0080 **	P = 0,2846	P = 0,4543	–

Tabela 21. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgG anty- koniugat liniowy-BSA oznaczonych w surowicach badanych grup.

grupa badana	liczba badanych	IgG anty-OmpC ± SD	IgG anty-kon. cykl.-BSA ± SD	IgG anty-kon. lin.-BSA ± SD
zdrowe dzieci	37	0,6722 ± 0,0481	2,2660 ± 0,0758	2,9270 ± 0,0557
pacjenci z PNO	117	0,6482 ± 0,0276	2,3410 ± 0,0502	2,7300 ± 0,0454
pacjenci z NZDO	76	0,7878 ± 0,0410	2,2630 ± 0,0522	2,6420 ± 0,0473
zdrowi dorośli	6	0,6625 ± 0,0649	2,0760 ± 0,1987	2,5110 ± 0,1396

SD – standard deviation (odchylenie standardowe)

Tabela 22. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, oznaczone wobec trzech antygenów użytych w teście ELISA (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA).

Dla każdej z badanych surowic wyznaczono indywidualną kontrolę, jaką była próba bez antygeny. Miało to na celu odrzucenie niespecyficznego wiązania przeciwciał do BSA używanego jako odczynnik blokujący wolne miejsca na dołku płytki titracyjnej po naniesieniu na nią antygenów. Ponadto, do syntezy koniugatów z peptydami cyklicznymi oraz liniowymi zastosowano białko nośnikowe – BSA, które również mogło dawać sygnał od przeciwciał związanych nieswoiście.

Wyznaczone miana przeciwciał uśredniono, a wartości średnich dla badanych grup pacjentów przedstawiono w Tabeli 22 wraz z wartościami odchyleń standardowych (SD). We wszystkich badanych grupach, średni poziom przeciwciał wyznaczonych wobec białka OmpC jako antygeny w teście, jest znacznie niższy niż określony w przypadku zastosowania któregośkolwiek z koniugatów. Ponadto różnicę w uśrednionym mianie przeciwciał możemy również zaobserwować w przypadku użycia każdego z koniugatów, ponieważ koniugat liniowy z BSA efektywniej wiąże przeciwciała niż koniugat cykliczny z BSA.

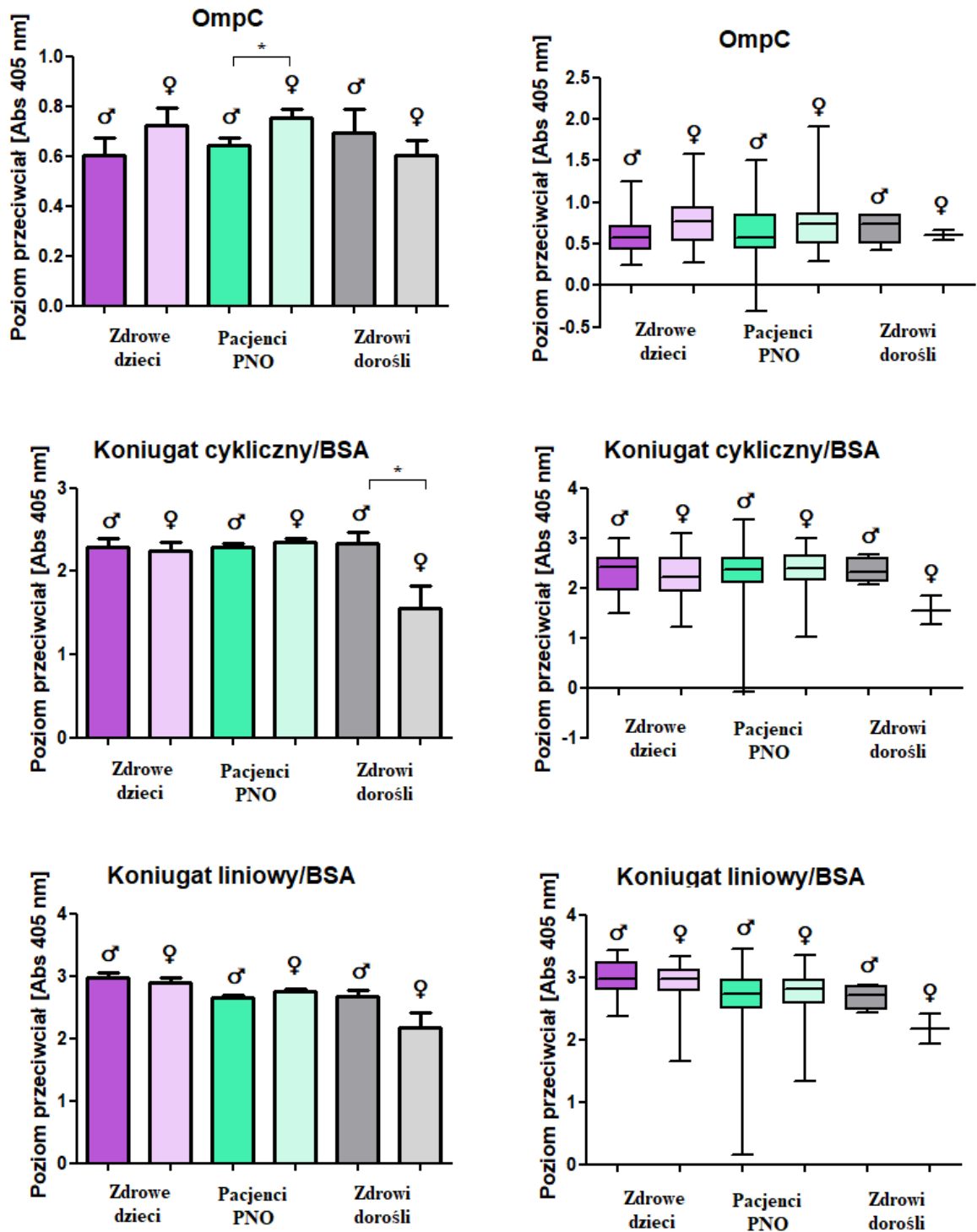
Takie obserwacje potwierdzają tezę przedstawioną w poprzednim podrozdziale ilustrującym różnice w poziomach swoistych przeciwciał klasy IgA. Na powierzchni białka OmpC występuje tylko jeden epitop wiążący swoiste przeciwciała anty-OmpC, dlatego po immobilizacji tego białka na powierzchni płytki titracyjnej epitop może być niedostępny dla przeciwciał. Dla koniugatów obsadzenie BSA peptydami cyklicznymi i liniowymi wynosi odpowiednio 4 i 6 peptydów na 1 cząsteczkę BSA. Dlatego niezależnie od tego w jakiej orientacji koniugat został związany do podłoża, część peptydów była nadal odpowiednio eksponowana i dostępna dla przeciwciał.

Uzyskane wyższe miano swoistych przeciwciał związanych przy użyciu koniugatu liniowego z BSA, jest najprawdopodobniej wynikiem większego stopnia obsadzenia BSA peptydami liniowymi niż cyklicznymi. Ta przewaga w poziomie wiązania przeciwciał do koniugatu liniowego świadczy również o tym, że peptyd liniowy równie efektywnie wiąże przeciwciała co peptyd cykliczny. Poddając analizie uśrednione miano swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicach w poszczególnych grupach badanych oznaczone w teście ELISA przy użyciu antygeny w postaci białka OmpC, istotne statystycznie różnice uzyskano w przypadku surowic pacjentów PNO/NZDO (Tabela 19). Przy użyciu koniugatu peptyd cykliczny z BSA stwierdzono, że wyniki średnich mian przeciwciał nie wykazują różnic istotnie statystycznych (Tabela 20).

Różnice w poziomie przeciwciał klasy IgG stwierdzono oznaczając miano przeciwciał testem ELISA w surowicach dzieci zdrowych i surowicach pacjentów (dzieci zdrowe/pacjenci PNO $P = 0,0244$ * oraz dzieci zdrowe/pacjenci NZDO $P = 0,0004$ ***),

stosując jako antygen koniugat peptydu liniowego z BSA, a także porównując miano w surowicach dzieci zdrowych i surowicach krwiodawców ($P = 0,0080^{**}$) w stosunku do tego samego antygeny (Tabela 21.). Jednak ze względu na ograniczony materiał kliniczny dotyczący surowic krwiodawców ($n = 6$), grupa ta nie była wystarczająco liczna do przeprowadzenia rzetelnej analizy.

Uśrednione miana przeciwciał klasy IgG oznaczone w trzech badanych grupach nie wykazały statystycznie istotnych różnic, aby wyłącznie na ich podstawie można było opracować odpowiednio wiarygodny test serologiczny. Jednak ze względu na ewentualną możliwość potencjalnych różnic w poziomie swoistych przeciwciał w zależności od płci czy wieku badanych, przeprowadzono odpowiednie analizy statystyczne.



Rycina 32. Analiza porównawcza miana swoistych przeciwciał anti-OmpC klasy IgG w surowicach kobiet (♀) i mężczyzn (♂) w zależności od antygeny (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA) użytego do testu ELISA.

grupa badana	pleć badanych	liczba badanych	IgG anty-OmpC ± SD	IgG anty-kon. cykl.-BSA ± SD	IgG anty-kon. lin.-BSA ± SD
zdrowe dzieci	M	16	0,6029 ± 0,0682	2,2960 ± 0,1059	2,9740 ± 0,0723
	K	21	0,7250 ± 0,0661	2,2430 ± 0,0184	2,8920 ± 0,0818
pacjenci z PNO	M	106	0,6438 ± 0,0302	2,2830 ± 0,0554	2,6510 ± 0,0508
	K	76	0,7509 ± 0,0363	2,3430 ± 0,0473	2,7450 ± 0,0453
zdrowi dorośli	M	4	0,6933 ± 0,0946	2,3390 ± 0,1263	2,6800 ± 0,1034
	K	2	0,6010 ± 0,0610	1,5490 ± 0,2830	2,1750 ± 0,2405

SD – standard deviation (odchylenie standardowe)

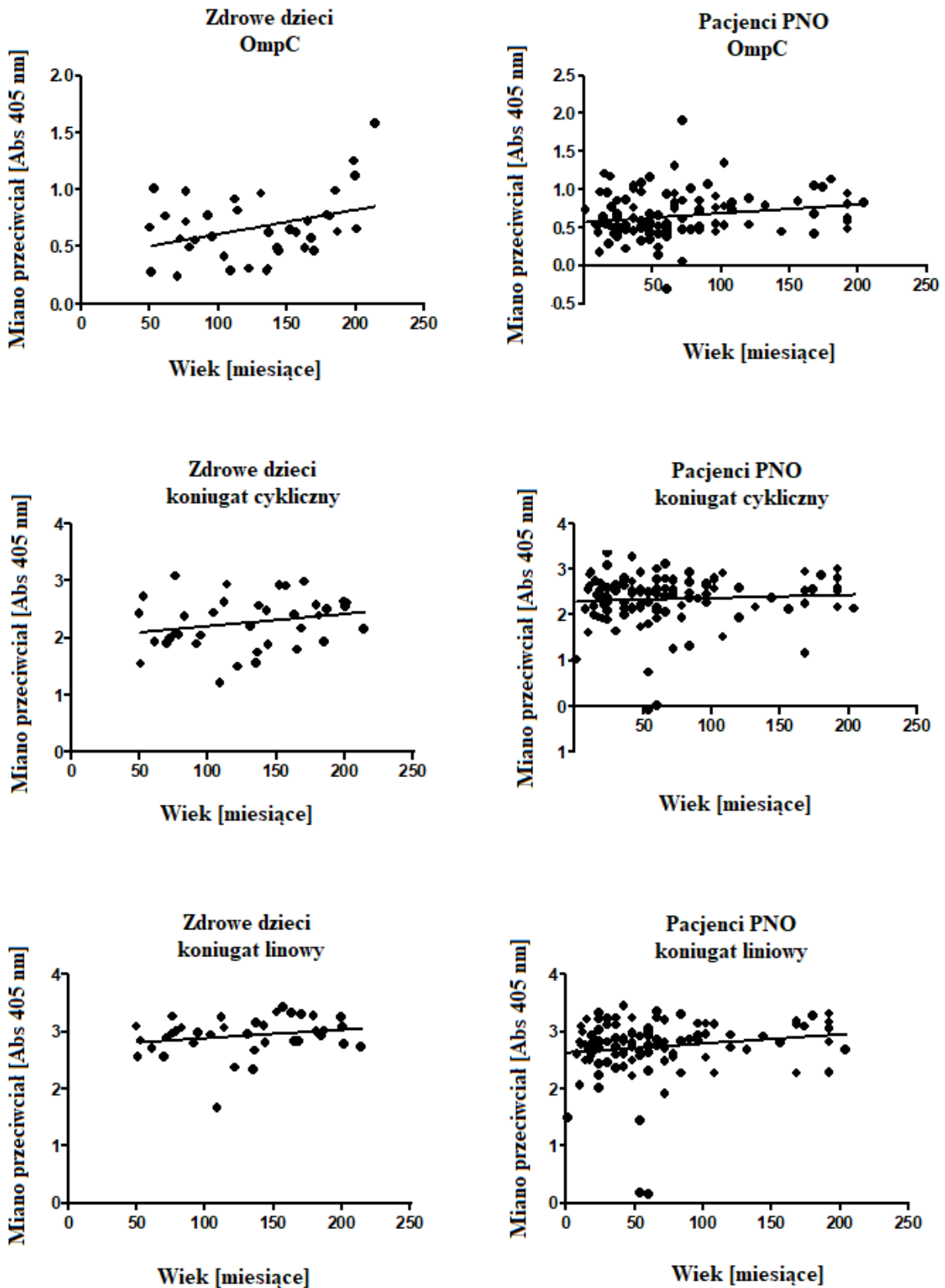
Tabela 23. Zestawienie uśrednionego miana swoistych przeciwciał klasy IgG, określonego wobec trzech antygenów (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA) oznaczonego w surowicach badanych grup z uwzględnieniem liczby i płci badanych.

IgG	anty-OmpC			anty-kon. cykl.-BSA			anty-kon. lin.-BSA		
	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	zdrowi dorośli	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	zdrowi dorośli	zdrowe dzieci	pacjenci z PNO	zdrowi dorośli
kobiety/ mężczyźni	0,2137	0,0240 *	0,5638	0,7361	0,4362	0,0370 *	0,4737	0,1853	0,0775

Tabela 24. Przedstawienie wartości P świadczącej o istotności statystycznej. Wynik $P < 0,05$ jest wynikiem istotnym statystycznie ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{}$, $P < 0,001^{***}$).**

Na rycinie 32 przedstawiono wykresy pudełkowe (box-plot) oraz słupkowe przedstawiające w grupach badanych (kobiety/mężczyźni) uśrednione poziomy swoistych przeciwciał anti-OmpC klasy IgG, reaktywnych w stosunku do trzech badanych antygenów (Tabela 23).

Z przedstawionych danych wynika, że średni poziom badanych przeciwciał nie różni się znacząco u kobiet i mężczyzn. Wyjątek stanowią poziomy przeciwciał w surowicach pacjentów różnej płci z grupy dzieci ze zdiagnozowanym PNO, dla których średni poziom swoistych przeciwciał oznaczony przy zastosowaniu jako antygenu białka OmpC różni się. Jednak nie są to wystarczające różnice, aby na ich podstawie można było opracować test serologiczny (Tabela 24). Różnicę zaobserwowano również w poziomie przeciwciał anti-OmpC w surowicach zdrowych dorosłych kobiet i mężczyzn oznaczone w stosunku do użytego jako antygenu w teście ELISA koniugatu peptydu cyklicznego z BSA, Jednak aby rzetelnie wyznaczyć te różnice należy zwiększyć liczebność tej grupy badanej.



Rycina 33. Przedstawienie średniego miana swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicach badanych grup, określonego dla trzech antygenów użytych w teście ELISA (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA), w zależności od wieku badanych.

IgG	liczba badanych	antygen użyty do testu	współczynnik r-Pearsona	Wartość P (poziom istotności statystycznej)
zdrowe dzieci	37	białko OmpC	0,351	0,033
		koniugat cykliczny z BSA	0,227	0,176
		koniugat liniowy z BSA	0,218	0,194
pacjenci z PNO	111	białko OmpC	0,195	0,041
		koniugat cykliczny z BSA	0,065	0,496
		koniugat liniowy z BSA	0,164	0,086

Tabela 25. Zestawienie wartości współczynników korelacji r-Pearsona z analizy zależności miana swoistych przeciwciał klasy IgG, określonego dla trzech antygenów (białko OmpC, koniugat liniowy-BSA, koniugat cykliczny-BSA), od wieku pacjentów (korelacja słaba r od -0,5 do 0,0 oraz 0,0 do 0,5, korelacja silna r od -1,0 do -0,5 oraz od 0,5 do 1,0). Wartość P świadczy o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{}$, $P < 0,001^{***}$).**

Analizując poziom swoistych przeciwciał anti-OmpC klasy IgG w grupach badanych w zależności od wieku, nie zaobserwowano znamienych różnic o czym świadczy wartość współczynnika r-Pearsona poniżej 0,5 oraz wartość $P > 0,05$ (Rycina 33) (Tabela 25). Z przedstawionej analizy poziomów swoistych przeciwciał klasy IgG wynika, że na ich wyłącznej podstawie nie można oprzeć testu serologicznego.

Jednak uzyskane wyniki całkowitej analizy poziomów swoistych przeciwciał w klasie IgA oraz IgG z uwzględnieniem wieku oraz płci pacjentów z różnych grup stanowią podstawę do pracy nad opracowaniem testu serologicznego do diagnostyki humoralnych niedoborów odporności. Uzyskane wyniki pokazują również, że pacjenci z PNO mają statystycznie istotny niższy poziom przeciwciał klasy IgA, co tłumaczy ich częstszą zapadalność na zakażenia pałeczkami jelitowymi oraz na ciężki przebieg takich infekcji.

Biorąc pod uwagę fakt rosnącej antybiotykooporności bakterii, uzasadnia to również badania prowadzone nad opracowaniem skutecznego terapeutycznego w postaci swoistych przeciwciał anti-OmpC z *S. flexneri*, do suplementacji niedoborów przeciwciał u pacjentów z PNO. Dlatego też przeprowadzono na modelu zwierzęcym badania, których celem było potwierdzenie ochronnego działania izolowanych przeciwciał anti-OmpC na zakażenia wywołane pałeczkami *S. flexneri*.

4.10. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych

Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały reaktywność surowicy krwi sznura pępowinowego z bakteryjnym białkiem OmpC [52]. Przeciwciała tam obecne przekazywane są dziecku przez matkę. Układ odpornościowy dziecka (noworodka) nie jest jeszcze zdolny do samodzielnego wytwarzania przeciwciał i zwalczania patogenów. Pozwala to sądzić, że przeciwciała te mają właściwości ochronne [51].

Badania reaktywności przeciwciał z białkiem OmpC, oraz innych antygenów zawierających epitop wiążący tego białka, stanowią obiecujący obszar badań aplikacyjnych nad otrzymaniem szczepionki, testu serologicznego do szybkiego oznaczania zakażenia/nosicielstwa *Shigella flexneri*, testu serologicznego do oznaczania humoralnych niedoborów odporności, czy opracowania terapeutycznego do suplementacji przeciwciał u osób z niedoborami. Charakterystyka reaktywności surowicy ludzkiej z bakteryjnym białkiem OmpC (oraz koniugatami cyklicznym/liniowym) pokazała znaczne różnice w poziomie przeciwciał u dzieci z PNO i u dzieci zdrowych. Uzyskane wyniki dają możliwość opracowania szybkiego testu do oznaczania niedoborów odporności, którego przeprowadzenie będzie możliwe w kilka godzin (test ELISA, Western Blot), a nawet kilkanaście minut (testy kasetkowe).

Potwierdzenie ochronnych właściwości przeciwciał anti-OmpC może posłużyć do opracowania preparatu do suplementacji przeciwciał dla osób z niedoborami. Wykonanie takiego badania *in vitro* jest niemożliwe. W warunkach laboratoryjnych możemy stwierdzić i opisać reaktywność przeciwciał z antygenem, ale nie pozwala to stwierdzić czy podanie przeciwciał pozwoli zahamować rozwój zakażenia pałeczkami *Shigella*. Jednoznaczne potwierdzenie tej tezy jest możliwe po uzyskaniu pozytywnych rezultatów badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym.

Potwierdzenia na modelu zwierzęcym wymagają również badania nad uzyskaniem szczepionki chroniącej przed rozwojem zakażenia. Jak wiadomo z wyżej opisanych badań, w surowicy ludzkiej znajdujemy przeciwciała reaktywne z bakteryjnym białkiem OmpC, rekombinowanym białkiem OmpC oraz z koniugatami BSA/peptyd cykliczny/liniowy. Przeciwciała te pojawiły się u badanych ludzi po kontakcie z pałeczkami *Shigella*, nie będącymi patogenami bezwzględnie. Jednak nie pozwala to na wzbudzenia trwałej odporności i ochronę przed ciężkim przebiegiem infekcji patogenem bezwzględnie. Dlatego ważne jest prowadzenie badań immunomodulacyjnych, które pozwolą opracować metodę wzbudzania odporności i ochrony przed rozwojem zakażenia patogenami chorobotwórczymi. Do wzbudzenia takiej odpowiedzi układu odpornościowego musimy

zastosować stymulację odpowiednim antygenem, a potwierdzenie tego również wymaga badań na modelu zwierzęcym.

4.10.1. Analiza właściwości ochronnych natywnego i rekombinowanego białka OmpC przeprowadzona na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia dawką LD₁₀₀ pałeczek *Shigella flexneri* 3a

We wcześniejszych badaniach zespołu naszego laboratorium wykazano, że podskórne podanie białek głównych błony zewnętrznej pałeczek *S. flexneri* 3a i *S. sonnei* FI świnkom morskim chroniło je przed zapaleniem rogówki i spojówki wywoływanym doświadczalnie za pomocą chorobotwórczego homologicznego lub heterologicznego szczepu bakterii. Działanie ochronne można było przenieść biernie na zwierzęta nieimmunizowane za pomocą surowicy z przeciwciałami [1].

Właściwości ochronne preparatów OMP, izolowanych z różnych szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae*, potwierdzono także na modelu mysim [82, 83, 125, 126, 127]. Wykazano, że niewielkie dawki preparatów zawierających OMP różnych serotypów *S. flexneri* podane zwierzętom, chroniły je całkowicie przed rozwojem zakażenia po podaniu im dawki LD₁₀₀ chorobotwórczego szczepu *S. flexneri* 3a. Działanie ochronne obserwowano również po immunizacji zwierząt preparatami OMP izolowanymi z innych gatunków bakterii, takich jak *S. sonnei* FI, *E. coli* czy *H. alvei*, co mogło świadczyć o szerokiej swoistości takiej ochrony [130]. Przedstawione badania wskazały na immunomodulacyjne działanie preparatów białkowych zawierających mieszaninę białek bakteryjnych. Dalsze etapy badań immunoreaktywności białek *S. flexneri* pozwoliły określić epitop wiążący przeciwciała anty-OmpC obecny na białku błony zewnętrznej o masie 38 kDa (OmpC) [51]. Badając reaktywność tego białka z surowicami ludzi oraz myszy i królików wykazano, że ludzki i mysi układ odpornościowy wytwarza przeciwciała skierowane na ten sam epitop. Dlatego do scharakteryzowania wpływu białka OmpC na układ odpornościowy wybrano model myszy. Preparat białka OmpC uzyskano z błony zewnętrznej *S. flexneri* 3a stosując ekstrakcję kwasem walerianowym i dwa etapy oczyszczania metodą chromatografii kolumnowej.

Do uzyskania wzbudzenia odpowiedzi ochronnej zastosowano immunizację myszy szczepu BALB/c preparatami natywnego i rekombinowanego białka OmpC ściany komórkowej pałeczek *S. flexneri* 3a. Rekombinowane białko OmpC uzyskano w systemie ekspresyjnym *E. coli* zgodnie z metodologią nr 3.13.

Zastosowane antygeny (natywne i rekombinowane OmpC) trzykrotnie co 48 godzin dootrzewnowo podano zwierzętom, a każda dawka użytego do immunizacji preparatu to 5 µg antygeny zawieszonego w 200 µl roztworu PBS. Grupę kontrolną stanowiły myszy (5 osobników w grupie), którym trzykrotnie co 48 godzin podano dootrzewnowo po 200 µl roztworu PBS. Po dwóch tygodniach od pierwszej immunizacji dootrzewnowo podano zwierzętom zawiesinę bakterii przygotowaną w roztworze PBS w dawce LD₁₀₀ (2×10⁸ bakterii/mysz). Schemat immunizacji i zakażenia zwierząt zawarty jest w Tabeli 7 w rozdziale nr 3.14.1., a uzyskane w omawianym doświadczeniu wyniki zawarte są w Tabeli 26.

Nr grupy	Dzień 1	Dzień 3	Dzień 5	Dzień 14	Liczba padłych zwierząt po [godz.] od podania patogenu,				% ochrony
					24	48	72	Σ	
1	PBS (kontrola)	PBS (kontrola)	PBS (kontrola)	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a	3	2	0	5	0
2	5 µg OmpC natywne	5 µg OmpC natywne	5 µg OmpC natywne	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a	1	0	0	1	80
3	5 µg OmpC rekombin.	5 µg OmpC rekombin.	5 µg OmpC rekombin.	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a	0	0	0	0	100

Tabela 26. Zestawienie wyników uzyskanych po immunizacji myszy preparatami natywnego i rekombinowanego białka OmpC i po zakażeniu zwierząt dawką LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było po 5 osobników.

Porównując uzyskane rezultaty w odniesieniu do wyników dla grupy kontrolnej, której podano jedynie roztwór PBS można zauważyć, że grupa zwierząt immunizowanych natywnym białkiem OmpC po zakażeniu dawką śmiertelną *S. flexneri* była chroniona w 80%. W tej grupie zwierząt procedury nie przeżyła jedna mysz, co mogło być wynikiem słabszej kondycji zwierzęcia, której przy użyciu dostępnych nam metod nie można było zauważyć przed rozpoczęciem eksperymentu. Zwierzęta w ciągu pierwszej doby po

podaniu patogenu wykazywały nieznaczne objawy chorobowe (nie kwalifikujące zwierzęcia do wcześniejszego poddania eutanazji), które ustępowały w kolejnym dniu obserwacji. Zwierzęta w grupie immunizowanej rekombinowanym białkiem OmpC również wykazywały ustępujące oznaki infekcji i w tej grupie wszystkie zwierzęta przeżyły procedurę.

Podanie zwierzętom zarówno natywnego jak i rekombinowanego białka OmpC skutkowało stymulacją układu odpornościowego, a w konsekwencji chroniło zwierzęta przed rozwojem zakażenia po podaniu im dawki śmiertelnej patogenu. Od myszy przed immunizacją i po 2 tygodniach od podania pierwszej dawki antygenów (przed zakażeniem), pobrano krew z żyły ogonowej, celem oznaczenia testem ELISA i porównania poziomu przeciwciał anti-OmpC w surowicach (Tabela 27).

Czas (t) oznaczenia poziomu przeciwciał	przeciwciała klasy IgM	przeciwciała klasy IgG
poziom przeciwciał anti-OmpC w surowicy myszy przed immunizacją gr. 1 w czasie t₀	0,130	0,112
poziom przeciwciał anti-OmpC w surowicy myszy gr. 2 po trzykrotnej immunizacji (3×5 µg) natywnym OmpC w czasie t₁₄	0,387	0,264
poziom przeciwciał anti-OmpC w surowicy myszy gr. 3 po trzykrotnej immunizacji 3×5 µg) rekombinowanym OmpC w czasie t₁₄	0,416	0,320

Tabela 27. Zestawienie oznaczonych testem ELISA poziomów przeciwciał anti-OmpC klasy IgM i IgG w surowicach myszy kontrolnych (gr. 1), myszy immunizowanych natywnym (gr. 2) i rekombinowanym (gr. 3) białkiem OmpC.

Po 14 dniach od immunizacji zwierząt pierwszą dawką preparatu białkowego, w obu grupach zwierząt zaobserwowano wzrost miana przeciwciał obu klas. Uzyskane wyniki poziomu przeciwciał potwierdzają immunostymulujący charakter podawanych

preparatów. Wysoki poziom ochrony zwierząt immunizowanych, zarówno natywnym jak i rekombinowanym białkiem OmpC, potwierdza wysoką swoistość przeciwciał wytwarzanych po stymulacji preparatami białkowymi w odniesieniu do rozpoznawania patogenu. Przeciwciała anti-OmpC, które myszy nabyły po immunizacji preparatem natywnego białka OmpC, wyizolowano metodą chromatografii powinowactwa. Następnie, przeciwciała te wykorzystano do potwierdzenia ochronnego wpływu przeciwciał anti-OmpC na rozwój zakażenia pałeczkami *S. flexneri* 3a.

4.10.2. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał anti-OmpC w badaniach modelowych na myszach przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami *Shigella flexneri* 3a w dawce LD₁₀₀

Przeprowadzone wcześniejsze badania modelowe naszego zespołu wykazały, że myszy immunizowane wieloskładnikowymi preparatami OMP wytwarzały przeciwciała, a podanie nieimmunizowanym zwierzętom surowicy pochodzącej od zwierząt immunizowanych, chroniło je przed rozwojem zakażenia pałeczkami *Shigella*, co świadczyło o wystąpieniu skuteczności biernej immunizacji myszy [1].

Przeciwciała czyli glikoproteiny wykazujące zdolność do specyficznego wiązania antygenów, stanowią element obrony organizmu przed drobnoustrojami chorobotwórczymi. W organizmie człowieka występuje pięć klas przeciwciał, a każda z nich charakteryzuje się wysokim poziomem zmienności. Obecność przeciwciał anti-OmpC *S. flexneri* stwierdzono także w surowicach krwi pępowinowej co wskazywało, że skoro przeciwciała te są przekazywane od matki do dziecka, to sugeruje to ich charakter ochronny [52]. Przeciwciała anti-OmpC *S. flexneri* występowały także w surowicach zdrowych krwiodawców i na odpowiednio niższym poziomie nawet u osób z pierwotnymi niedoborami immunologicznymi [132].

Te wszystkie wymienione przesłanki oraz wyniki uzyskane z badań przeprowadzonych na tej dużej puli surowic zdrowych ludzi i pacjentów z niedoborami, mogły sugerować ochronny charakter przeciwciał anti-OmpC i skierowały nasze zainteresowania w stronę poszukiwań możliwości opracowania bezpiecznego terapeutyku (przeciwciał) o charakterze ochronnym do suplementacji u osób z niedoborami immunologicznymi. Takie założenie wymagało jednoznacznego potwierdzenia ochronnego wpływu przeciwciał anti-OmpC na rozwój zakażenia pałeczkami *Shigella*. Ze względu na reaktywność przeciwciał surowicznych ludzi i myszy z tym samym epitopem obecnym na białku OmpC, do przeprowadzenia testu na modelu zwierzęcym wybrano

myszy. Przeciwciała ludzkie wykorzystane do testów pozyskano z surowicy krwiodawców, a przeciwciała mysie z surowicy zwierząt po immunizacji bakteryjnym białkiem OmpC. Przeciwciała izolowano z surowicy za pomocą chromatografii powinowactwa do złoża Sepharose CL-4B–OmpC. Następnie przeciwciała po izolacji i odpłukaniu soli używanych w procesie separacji rozcieńczono roztworem PBS aby uzyskać odpowiednie stężenie. Tak przygotowane preparaty immunoglobulin zawierały swoiste przeciwciała anti-OmpC wszystkich klas.

Mimo, że oznaczone w teście ELISA poziomy przeciwciał i następnie określone średnie różnice poziomu przeciwciał w surowicach dzieci zdrowych i dzieci z PNO uzyskano jedynie dla przeciwciał w klasie IgA, to jednak ogólnie wiadomo, że w zwalczanie patogenu są zaangażowane przeciwciała wszystkich klas. Dlatego też preparat swoistych przeciwciał zastosowany do badań na modelu zwierzęcym, zawierał przeciwciała wszystkich klas swoście wiążących białko OmpC i tak przygotowane preparaty podano zwierzętom zgodnie ze schematem immunizacji biernej (Tabela 28).

W celu potwierdzenia ochronnego działania swoistych przeciwciał anti-OmpC, które powinny stanowić źródło zabezpieczenia zwierząt przed rozwojem zakażenia pałeczkami *Shigella*, zaplanowano doświadczenia na modelu zwierzęcym. Tylko tak uzyskane wyniki miały przedstawiać wiarygodną odpowiedź organizmu na zakażenie. Doświadczenie przeprowadzono na trzydziestu 6–9 tygodniowych samicach myszy szczepu BALB/c. Zwierzęta po kwarantannie podzielono na 6 grup po 5 myszy w każdej grupie i umieszczono w odpowiednio wyposażonych klatkach. Preparaty immunoglobulin w dawce 10 µg/mysz zawieszono w 200 µl roztworu PBS podano zwierzętom jednorazowo, dwukrotnie lub trzykrotnie w odpowiednich w zależności od grupy zwierząt odstępach czasu (Tabela 28). Czas pomiędzy immunizacją bierną, a zakażeniem zwierząt był znacznie krótszy niż przy immunizacji aktywnej ze względu na serokonwersję.

Przeciwciała ludzkie podawane zwierzętom są rozpoznawane przez ich układ odpornościowy jako obce białko i neutralizowane. Jak podaje literatura [12, 29, 35, 56, 64, 106], okres półtrwania przeciwciał podawanych w ten sposób jest znacznie krótszy niż przeciwciał wytwarzanych przez organizm podczas immunizacji aktywnej, a ich miano znacząco spada z każdym dniem po podaniu. W czasie, kiedy miano ludzkich lub mysich przeciwciał anti-OmpC było najwyższe, czyli zaraz po ich jednokrotnym lub dwukrotnym podaniu, przeprowadzono zakażenie zwierząt bakteriami zakładając, że w tym właśnie czasie nastąpi efektywna opsonizacja i neutralizacja patogenu. Zwierzęta zakażono dawką śmiertelną pałeczek *Shigella flexneri* 3a ($LD_{100} = 2 \times 10^8$ bakterii/mysz).

Zastosowana dawka LD₁₀₀ pałeczek *S. flexneri* 3a dla myszy BALB/c ustalona została na podstawie rezultatów badań na modelach zwierzęcych przeprowadzonych w laboratorium w latach wcześniejszych. Po zakażeniu zwierzęta obserwowano przez 72 godziny. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 28 zamieszczonej poniżej.

Nr grupy	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Liczba padłych zwierząt po [godz.]				% ochrony
				24	48	72	Σ	
1	PBS (kontrola)	PBS	PBS (kontrola)	3	2	0	5	0
		1 godzina przerwy						
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a						
2	10 µg Ab (ludzkie)	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a	–	0	5	0	5	0
3	10 µg Ab (ludzkie)	10 µg Ab (ludzkie)	–	0	4	0	4	20
		1 godzina przerwy						
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a						
4	10 µg Ab (ludzkie)	10 µg Ab (ludzkie)	10 µg Ab (ludzkie)	0	5	0	5	0
		1 godzina przerwy						
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a						
5	10 µg Ab (mysie)	10 µg Ab (mysie)	10 µg Ab (mysie)	0	5	0	5	0
		1 godzina przerwy						
		LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a						
6	10 µg Ab (ludzkie)	LD ₁₀₀ <i>Shigella flexneri</i> 3a	10 µg Ab (ludzkie)	2	3	0	5	0

Tabela 28. Zestawienie wyników uzyskanych po biernej immunizacji myszy preparatami ludzkich lub mysich przeciwciał anti-OmpC *S. flexneri* 3a i zakażeniu zwierząt dawką LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było po 5 osobników.

W czasie pierwszej doby od podania patogenu zwierzęta z grup 2–5 wykazywały 100% ochrony w porównaniu do grupy kontrolnej nr 1 (ochrona 40% w ciągu 24 godzin od infekcji). W tym samym czasie w grupie nr 6 padły 2 osobniki, co daje ochronę na poziomie 60%. Taki wynik sugeruje, że podane w tej grupie myszy w przeddzień zakażenia swoiste przeciwciała anti-OmpC zostały zdezaktywowane przez myszy układ odpornościowy.

W ciągu kolejnego dnia obserwacji zwierząt od podania patogenu padły wszystkie zwierzęta. Takie rezultaty mogły wynikać albo ze zbyt niskich dawek przeciwciał użytych do immunizacji lub przyjęta procedura postępowania dotycząca terminu podania dawki przeciwciał w stosunku do czasu zakażenia, jest nieskuteczna. Być może również zastosowana dawka przeciwciał w stosunku do wysokiej dawki bakterii (LD₁₀₀), była nieoptymalna.

Na podstawie uzyskanych rezultatów z immunizacją bierną swoistymi przeciwciałami anti-OmpC stwierdzono, że aby w tym przypadku uzyskać skuteczną ochronę, należy przede wszystkim zwiększyć dawkę aktywnych przeciwciał podawanych zwierzętom. Należy jednak podkreślić, że zwierzęta które były immunizowane biernie przeciwciałami nie wykazywały żadnych oznak chorobowych po podaniu preparatu przeciwciał, co świadczy o jego bezpiecznym charakterze.

4.10.3. Analiza właściwości ochronnych ludzkich i mysich przeciwciał na modelu mysim przy zastosowaniu zakażenia zwierząt pałeczkami *Shigella flexneri* 3a w dawce LD₅₀

Po uzyskaniu zgody od Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (nr zgody NR 020/2021/P1 oraz NR 066/2022/P2) na wykonanie doświadczenia modelowego z dawką LD₅₀ bakterii przeprowadzono zoptymalizowaną procedurę. Z uwagi na zmianę dawki bakterii, czyli obniżenie jej z LD₁₀₀ do LD₅₀, a mając na uwadze przede wszystkim uzyskanie jednoznacznej odpowiedzi, zwiększono liczebność grup zwierząt do 10 osobników w grupie. Zastosowana dawka LD₅₀ pałeczek *S. flexneri* 3a dla myszy BALB/c ustalona została na podstawie rezultatów badań na modelach zwierzęcych przeprowadzonych w laboratorium w latach wcześniejszych. Procedurę wykonano na czterdziestu 6–9 tygodniowych samicach myszy szczepu BALB/c. Każda z 4 grup zwierząt składała się z 10 osobników. Zwierzęta były immunizowane 3-krotnie w 24-godzinny odstępie czasu.

Zwierzętom z grupy nr 1 podano jedynie roztwór PBS (grupa kontrolna), zwierzętom z grup nr 2 i 3 podano trzykrotnie przeciwciała ludzkie kolejno po 50 µg lub

100 µg, a grupie nr 4 podano trzykrotnie po 50 µg przeciwciał mysich. Wszystkie preparaty zawieszono w 200 µl roztworu PBS zostały podane dootrzewnowo. Zwierzęta, po immunizacji swoistymi ludzkimi lub mysimi przeciwciałami anti-OmpC, zakażano dawką $LD_{50} = 7 \times 10^7$ bakterii/mysz (w 200 µl PBS). Po zakażeniu zwierzęta obserwowano przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono w Tabeli 29.

Nr grupy	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Liczba padłych zwierząt, po [godz.] od podania patogenu				% ochrony
				24	48	72	Σ	
1	PBS (kontrola)	PBS	PBS (kontrola)	4	2	0	6	40
		1 godzina przerwy						
		LD_{50} <i>Shigella flexneri</i> 3a						
2	50 µg Ab (ludzkie)	50 µg Ab (ludzkie)	50 µg Ab (ludzkie)	0	0	0	0	100
		1 godzina przerwy						
		LD_{50} <i>Shigella flexneri</i> 3a						
3	100 µg Ab (ludzkie)	100 µg Ab (ludzkie)	100 µg Ab (ludzkie)	0	0	0	0	100
		1 godzina przerwy						
		LD_{50} <i>Shigella flexneri</i> 3a						
4	50 µg Ab (mysie)	50 µg Ab (mysie)	50 µg Ab (mysie)	0	0	0	0	100
		1 godzina przerwy						
		LD_{50} <i>Shigella flexneri</i> 3a						

Tabela 29. Zestawienie wyników uzyskanych po biernej immunizacji myszy preparatami ludzkich lub mysich przeciwciał anti-OmpC *S. flexneri* 3a i zastosowaniu zakażenia zwierząt dawką LD_{50} bakterii. W każdej grupie zwierząt było po 10 osobników.

Po podaniu preparatów z przeciwciałami zwierzęta nie wykazywały oznak chorobowych. W przeprowadzonym doświadczeniu modelowym stwierdzono, że po 24 godzinach od zakażenia padły 4 myszy z grupy nr 1 (grupa kontrolna), a u pozostałych myszy pojawiły się pewne oznaki zakażenia, takie jak: nastroszona sierść, osowiałość, osłabiona reakcja na bodźce.

Zwierzęta z grup nr 1 i nr 2 miały nasilone objawy w stosunku do zwierząt z grup nr 3 i nr 4. Po 48 godzinach od zakażenia padły kolejne 2 myszy z pierwszej grupy. U pozostałych zwierząt objawy chorobowe zmniejszyły się, jednak u myszy z grup nr 1 i nr 2 były bardziej nasilone niż u myszy w grupach nr 3 i nr 4.

Po 72 godzinach od zakażenia zwierzęta wyglądały znacznie lepiej niż w poprzednich dniach. Grupa nr 1 prezentowała się trochę gorzej od pozostałych grup zwierząt. Śmiertelność grupy kontrolnej (myszy immunizowane roztworem PBS) wynosiła 60% (padło 6/10 zwierząt) w ciągu trwania eksperymentu, tj. 72 godziny od podania patogenu. Pozostałe zwierzęta przeżyły, co jednoznacznie potwierdza ochronny wpływ podawanych przeciwciał. Spodziewana śmiertelność zwierząt z grupy kontrolnej wynosiła 50% (LD_{50} – Lethal Dose 50%), jednak śmiertelność wyznaczona eksperymentalnie wyniosła 60%. Ta różnica najprawdopodobniej wynika z różnic osobniczych między zwierzętami.

Zwierzęta z grupy nr 2, trzykrotnie immunizowane ($3 \times 50 \mu\text{g}$) ludzkimi przeciwciałami jak i zwierzęta z grupy nr 4, immunizowane trzykrotnie ($3 \times 50 \mu\text{g}$) mysimi przeciwciałami, wykazywały silniejsze objawy zakażenia, niż zwierzęta z grupy nr 3, które trzykrotnie otrzymały większą dawkę ludzkich przeciwciał ($3 \times 100 \mu\text{g}$).

Pozwala to sądzić, że obie dawki przeciwciał ludzkich chroniły zwierzęta przed rozwojem infekcji i śmiercią oraz że większa sumaryczna dawka swoistych ludzkich przeciwciał ($3 \times 100 \mu\text{g}$) anty-OmpC skuteczniej chroniła zwierzęta, o czym świadczą dużo łagodniejsze objawy infekcji u zwierząt, którym podano więcej przeciwciał. Zwierzęta immunizowane przeciwciałami ludzkimi i mysimi w tych samych dawkach ($3 \times 50 \mu\text{g}$ Ab) przeżyły procedurę, jednak wykazywały różnicę w przebiegu infekcji. Zwierzęta, którym podano przeciwciała mysie miały łagodniejsze objawy w stosunku do myszy, którym podano przeciwciała ludzkie. Świadczy to o efektywniejszym działaniu układu immunologicznego zwierząt na patogen zopsonizowany przeciwciałami własnego gatunku.

Z zawiesiny bakterii podawanej zwierzętom wyznaczono rzeczywistą liczbę CFU (szereg rozcieńczeń). Wartość wyznaczona z gęstości optycznej (OD_{600}) wynosiła $3,5 \times 10^8$ bakterii/ml, natomiast wyznaczona doświadczalnie wynosiła $2,8 \times 10^8$ bakterii/ml.

Powodem oznaczonej z zastosowaniem metody szeregu rozcieńczeń nieco obniżonej zawartości żywych bakterii, może być kilkugodzinny czas oczekiwania zawiesiny bakterii na wykonanie szeregu rozcieńczeń i posiew.

Przeprowadzone według powyższego schematu doświadczenie w sposób jednoznaczny potwierdziło ochronny wpływ przeciwciał anti-OmpC na rozwój zakażenia pałeczkami *Shigella*. Uzyskane wyniki są podstawą do dalszych prac nad terapeutycznym suplementującym przeciwciała u pacjentów z humoralnymi niedoborami odporności.

5. Dyskusja

Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* są patogenami wywołującymi biegunki, dur brzuszny, czerwonkę bakteryjną i inne schorzenia jelitowe. Te drobnoustroje stanowią problem, zwłaszcza w krajach rozwijających się, gdzie powodują najwięcej zakażeń kończących się śmiercią [40]. Do zakażenia dochodzi zazwyczaj drogą pokarmową poprzez skażoną żywność i wodę oraz przez kontakty osobiste [50]. Dlatego, w czasach, kiedy znacząco wzrósł poziom migracji ludności, jesteśmy niewątpliwie bardziej narażeni na kontakty z tymi patogenami. Najczęściej zakażeniom ulegają dzieci, osoby starsze oraz ludzie, których układ odpornościowy nie funkcjonuje prawidłowo.

W skutecznym leczeniu zakażeń bakteryjnych ogromnym problemem jest pojawianie się szczepów opornych na antybiotyki i inne leki przeciwdrobnoustrojowe. W 2017 roku WHO wydało dokument, w którym na tle innych patogenów wielolekoopornych wykazuje, że gatunki z rodzaju *Shigella* należą do grupy trzeciej ważnych patogenów w kontekście poszukiwania nowych metod terapeutycznych ze względu na narastający problem lekooporności [76]. W podjęciu skutecznego leczenia również ważna jest prawidłowa i szybka diagnoza, dobór odpowiednich leków oraz jak najszybsze wdrożenie terapii. Stosowane metody w laboratoriach diagnostycznych wymagają zarówno nakładów finansowych jak i czasowych, co zdecydowanie utrudnia walkę z tymi patogenami.

Pacjenci cierpiący na zespoły chorobowe należące do pierwotnych niedoborów odporności (PNO) są zdecydowanie bardziej narażeni na infekcje. Pierwotne niedobory odporności, to grupa chorób przejawiających się wadami w funkcjonowaniu układu odpornościowego o podłożu genetycznym. Najczęściej występującymi z PNO są te związane z niedoborem przeciwciał. Przez takie defekty układu immunologicznego infekcje rozwijają się szybciej, trudniej poddają się leczeniu i często nawracają [20, 84].

Terapia stosowana przy niedoborach przeciwciał opiera się na profilaktycznej lub interwencyjnej antybiotykoterapii, szczepieniach ochronnych, leczeniu substytucyjnym (preparatami immunoglobulin, składników dopełniacza, czynników wzrostu) lub przeszczepach szpiku. Najskuteczniejszym, najmniej inwazyjnym i najbezpieczniejszym sposobem walki z patogenami u pacjentów z PNO, jest leczenie dożylnie preparatami immunoglobulin (IVIG) lub podanie ich w formie iniekcji podskórnych [99, 104]. Zapobieganie infekcjom oraz leczenie, poprzez suplementację brakujących przeciwciał jest

bardzo obiecującą terapią dla wielu chorych, także tych cierpiących na zakażenia towarzyszące pierwotnym oraz wtórnym niedoborom odporności [104].

Czynnikiem etiologicznym, zakażeń występujących u pacjentów z PNO, są często bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, m.in. bakterie z rodzaju *Shigella*. Przyczyną infekcji tego typu są najczęściej pałeczki *Shigella flexneri* i *Shigella sonnei*, które wywołują shigellozy, czerwonkę bakteryjną, czy zapalenie okrężnicy. U ludzi z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, zakażenia te mogą ustępować samoistnie, bądź po podaniu antybiotyku, natomiast u pacjentów z niedoborami, nie da się ich wyleczyć całkowicie i często nawracają powodując ciężkie zapalenia błon śluzowych odbytu i jelit, którym towarzyszą krwawe i ropne biegunki [19, 84].

W skutecznym leczeniu wielu infekcji, także jelitowych, ważne jest określenie patogenu stanowiącego czynnik etiologiczny zakażenia oraz szybkie wdrożenie terapii. W przypadku pacjentów z PNO, możemy zdiagnozować niedobór danych przeciwciał przed wystąpieniem zakażenia i poprzez ich suplementację zapobiec infekcji, a kiedy już do niej doszło, ułatwić w ten sposób leczenie.

Badania nad białkami błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych realizowane w naszym zespole pozwoliły stwierdzić, że białko OmpC z *S. flexneri* 3a jest immunogenne [51]. W prowadzonych badaniach na modelu mysim stwierdzono, że białko OmpC występujące w przewodzie w wieloskładnikowym preparacie białek błony zewnętrznej, podane zwierzętom wzbudzało odpowiedź o charakterze ochronnym i zabezpieczało je przed rozwojem zakażenia, nawet po podaniu im dawki bakterii znacznie przekraczającej śmiertelną dawkę LD₁₀₀ [125, 128].

Wstępne badania dotyczące obecności przeciwciał anti-OmpC w surowicy ludzkiej wykazały obecność ich w surowicy ludzi zdrowych i na znacznie niższym poziomie w surowicy dzieci z niedoborami immunologicznymi [132]. Stwierdzono także obecność przeciwciał anti-OmpC w ludzkiej surowicy krwi pępowinowej [51]. Przeciwciała anti-OmpC, występujące w krwi pępowinowej przekazywane są dziecku przez matkę, co może świadczyć o tym, że mogą mieć one charakter ochronny.

Białko OmpC jest składnikiem błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a i porównanie o strukturze β -baryłki, której fragmenty (pętle) są eksponowane na zewnątrz komórek bakterii. Należy do tzw. białek głównych *Shigella flexneri* i w porównaniu do pozostałych białek błony zewnętrznej, wykazuje największą immunoreaktywność z przeciwciałami surowicy ludzkiej krwi pępowinowej [132]. Białko to ze względu na ekspozycję swoich fragmentów na zewnątrz błony bakteryjnej, jest rozpoznawane przez

układ immunologiczny gospodarza dzięki czemu jest głównym antygenem biorącym udział we wzbudzeniu odpowiedzi odpornościowej, co potwierdzono w eksperymentach protekcyjnych na modelu mysim [125, 128].

Do badania immunoreaktywności białka OmpC konieczne jest uzyskanie go w czystej, homogennej formie. Dlatego do ekstrakcji tego białka z błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* zastosowano metodę ekstrakcji kwasem walerianowym wg Arcidiacono i wsp. [3], która po modyfikacjach pozwoliła na uzyskanie mieszaniny białek z większościovym udziałem białka OmpC. Następnie po zastosowaniu technik chromatografii kolumnowej w systemie FPLC (filtracja żelowa i chromatografia jonowymienna) uzyskano homogeny preparat tego białka [49]. Dwuetapowe oczyszczanie białka pozwoliło na uzyskanie wysokiej wydajności procesu oraz na uzyskanie białka OmpC w formie reaktywnej z przeciwciałami co potwierdzono w testach immunoenzymatycznych.

Białko OmpC naturalnie występujące w błonie jest wysoce hydrofobowe i po wyizolowaniu wykazuje tendencję do agregacji, utraty struktury i tym samym utraty reaktywności z przeciwciałami. Dlatego, aby temu zapobiec i uzyskać wysoki stopień rozpuszczalności, niezbędne było zastosowanie różnego rodzaju detergentów, soli i czynników chaotropowych [8].

Wcześniejsze prowadzone w naszym zespole badania Jarzab i wsp. [52] dotyczące białka OmpC, pozwoliły na wytypowanie pętli znajdującej się w zewnątrz błonowej części tego białka, która najsilniej oddziałuje z przeciwciałami ludzkimi [52].

Mapowanie epitopu zawartego w tej pętli, pozwoliło na określenie jego 12-aminokwasowej sekwencji (GLNRYDERYIGC) oraz najkrótszej sekwencji tego peptydu (RYDERY) niezbędnej do skutecznego oddziaływania z przeciwciałami anty-OmpC obecnymi w surowicy [52]. Zsyntezowano także kilka peptydów liniowych, które zawierały sekwencję RYDERY i skoniugowano je z polilizyną, ale ich właściwości immunogenne nie pozwalały na efektywną ochronę zwierząt po immunizacji, a do immunizacji zwierząt konieczne było podanie adiuwantu (MPL), który zaś sam wzbudzał silną reakcję immunologiczną maskującą działanie epitopu [52].

Wymagało to użycia do konstrukcji koniugatu innego nośnika, toksoidu tężcowego, z którym koniugowano peptydy cykliczne GLNRYDERYIGC-TT(c), GGLNRYDERYIGC-TT(c), GGGLNRYDERYIGC-TT(c) oraz liniowy GLNRYDERYIGC-TT(l) zawierające w swoim rdzeniu minimalną wiążącą przeciwciała sekwencję aminokwasową RYDERY. Wydłużanie sekwencji poprzedzającej o dodatkowe

reszty glicyny pokazało, że największe powinowactwo do przeciwciał wykazuje koniugat cykliczny poprzedzony dwiema resztami glicyny [52]. Kolejnym białkiem nośnikowym użytym do koniugacji z peptydami była albumina surowicy bydlęcej. Otrzymano w ten sposób koniugaty GGLNRYDERYIGC-BSA(c) oraz GLNRYDERYIGC-BSA(l). Dzięki szczepieniu myszy tymi koniugatami wykazano, że dają one wyższe miano przeciwciał niż po szczepieniu samym białkiem nośnikowym TT lub BSA [52].

Kontynuując wcześniejsze badania, dotyczące szerokiej charakterystyki białka OmpC i określenia jego reaktywności z przeciwciałami, uzyskano rekombinowane białko OmpC i wykorzystano je w tym celu. Należy zauważyć, że otrzymane białko OmpC rekombinowane w systemie ekspresyjnym *E. coli*, wykazywało tendencję do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów. W buforach, które nie zawierały wysokiego stężenia detergentu lub mocznika możliwe było uzyskanie jego rozpuszczalnej formy o niewielkim stężeniu.

Problem rozpuszczalności rekombinowanych białek błonowych stanowi wyzwanie dla wszystkich badaczy zajmujących się tym zagadnieniem. Molina i wsp. [81] w badaniach nad błonowym białkiem YidC (61 kDa) zajmowali się ekspresją i oczyszczaniem rekombinowanego białka w prokariotycznym systemie ekspresyjnym (*E. coli*).

Naturalne środowisko białek błonowych jest bogate w związki hydrofobowe budujące dwuwarstwę lipidową, które należy odseparować w procesie oczyszczania. Tak drastyczna zmiana warunków w których znajduje się białko skutkowałaby natychmiastowym wytrąceniem się go z roztworu. W celu minimalizowania ryzyka wytrącenia się białka z roztworu należy przygotować bufor odwzorowujący naturalne środowisko błony. W tym celu zazwyczaj stosuje się detergenty umożliwiające rozpuszczanie takich białek w środowisku wodnym. Innymi czynnikami wpływającymi na stabilność solubilizowanego białka są np. skład buforu (pH, sole), obecność kofaktorów itp. Obecność innych komponentów buforu, niezbędnych do otrzymania rozpuszczalnej formy białka, może znacznie utrudnić lub uniemożliwić jego zastosowanie w testach biologicznych wpływając na wyniki immunoreaktywności. Molina i wsp. [81] zauważa, że znalezienie optymalnych parametrów jest czasochłonne i obecnie nie ma niezawodnych i uniwersalnych procedur analitycznych umożliwiających badanie przesiewowe wielu parametrów w krótkim czasie.

W przeprowadzonych badaniach modelowych na myszach wykazano, że trzykrotna immunizacja myszy białkiem OmpC pozwoliła na ochronę przed zakażeniem wywołanym podaniem dawki LD₁₀₀ bakterii. Wykazano, że po dwóch tygodniach od immunizacji miano

przeciwciał anty-OmpC klasy IgM wzrosło trzykrotnie po szczepieniu natywnym lub rekombinowanym białkiem OmpC. Miano przeciwciał klasy IgG wzrosło dwukrotnie po immunizacji natywnym białkiem OmpC oraz trzykrotnie po immunizacji rekombinowanym białkiem OmpC.

Stwierdzono ponadto, że podanie myszom rekombinowanego białka OmpC skutkuje wyższym poziomem immunizacji niż podanie zwierzętom jego formy natywnej, przez co jest obiecującym, chociaż pod względem rozpuszczalności trudnym, kandydatem do badań nad szczepionką chroniącą przed shigellozą. Szczepionka oparta na białku OmpC lub rekombinowanym białku OmpC, posiada duży potencjał także ze względu na wysokie podobieństwo (homologię) sekwencji aminokwasowej białek głównych wszystkich *Enterobacteriaceae*, na powierzchni których znajduje się epitop wiążący przeciwciała. Wiadomo, że przeciwciała anty-OmpC *Shigella flexneri* 3a reagują z innymi białkami pozyskanymi ze szczepów enterobakterii [129]. Ze względu na wysoką homologię białek głównych *Enterobacteriaceae*, przeciwciała anty-OmpC *Shigella flexneri* powinny dawać ochronę krzyżową przed rozwojem infekcji innymi szczepami z tej rodziny. Wcześniejsze nasze badania na modelu mysim wykazały ochronę zwierząt immunizowanych preparatami białkowymi z *Shigella flexneri* 3a po zakażeniu różnymi szczepami enterobakterii [126, 128].

Wielu innych badaczy również potwierdza uniwersalność szczepionek na bazie białka OmpC. Wang i wsp. [122] wykazali, że surowica myszy po szczepieniu rekombinowanym białkiem OmpC wykazuje wysoką reaktywność z białkami wielu innych gatunków bakterii takich jak *E. coli*, *S. flexneri* i *S. dysenteriae*, a z przedstawicielami innych gatunków Gram-ujemnych bakterii, takich jak *Pseudomonas aeruginosa*, surowica nie wykazuje reaktywności [122].

Do podobnych wniosków doszli badacze zajmujący się zakażeniami, których czynnikiem etiologicznym jest paciorkowiec *Streptococcus pneumoniae*. Briles i wsp. [13] wykazali, że po immunizacji myszy rekombinowanym, pnemokokowym białkiem powierzchniowym A (rPspA) doszło do wytworzenia u zwierząt przeciwciał chroniących przed zakażeniem paciorkowcem *Streptococcus pneumoniae*. Badania I fazy z rekombinowanym białkiem PspA wykazały, że białko to jest immunogenne u ludzi. Zbadano próbki surowicy przed i po immunizacji z tej próby i stwierdzono, że ludzkie przeciwciała przeciwko PspA może chronić myszy przed infekcją pneumokokową. Próbki surowicy osobników immunizowanych dwukrotnie 125 µg PspA miały ponad 100 razy więcej przeciwciał na mililitr niż było wymagane do skutecznej ochrony myszy przed śmiertelnymi skutkami infekcji (1,3 µg/dawkę). Co najmniej 98% PspA należy do rodziny

PspA 1 lub 2. Ludzkie przeciwciała indukowane przez rodzinę białek PspA 1 chroniły przed zakażeniem *S. pneumoniae* wykazującym ekspresję PspA 1 lub PspA 2 oraz szczepami 3 testowanych typów otoczek: 3, 6A i 6B. Badania te sugerują, że PspA może wykazywać skuteczność jako szczepionka dla ludzi [13].

Charakterystyka reaktywności przeciwciał anti-OmpC z *S. flexneri* jest kluczowym etapem przy opracowaniu i optymalizacji testu serologicznego do wykrywania humoralnych niedoborów odporności. Większość niedoborów immunologicznych związana jest z zaburzeniami wytwarzania przeciwciał chroniących przed różnego rodzaju zagrożeniami jak zakażenie patogenami, które u pacjentów PNO jest szczególnie niebezpieczne, dlatego tak ważne jest szybkie zdiagnozowanie problemu i wdrożenie odpowiedniej terapii.

Do oznaczenia i porównania poziomu przeciwciał anti-OmpC w surowicy pacjentów z różnego rodzaju niedoborami immunologicznymi i osób zdrowych zastosowano trzy antygeny, bakteryjne białko OmpC z *Shigella flexneri* 3a oraz dwa koniugaty zawierające epitop wiążący przeciwciała z białka OmpC: koniugat cykliczny GGLNRYDERYIGC-BSA(c) oraz liniowy GLNRYDERYIGC-BSA(l). Poziomy przeciwciał klasy IgG i IgA oznaczono w surowicach trzech grup pacjentów: dzieci z PNO/NZDO, dzieci z niestwierdzonym PNO oraz u zdrowych dorosłych.

Oznaczone poziomy przeciwciał anti-OmpC klasy IgG w surowicach badanych grup, nie wykazały statystycznie istotnych różnic. Dlatego też można sądzić, że określanie poziomu przeciwciał anti-OmpC tej klasy, nie jest najlepszym wskaźnikiem niedoborów humoralnych. Istotność statystyczną na wysokim poziomie (***) uzyskano porównując poziomy przeciwciał anti-OmpC klasy IgA w surowicach dzieci zdrowych i pacjentów z PNO/NZDO oraz w surowicach zdrowych dorosłych i pacjentów z PNO/NZDO. Wysoki poziom istotności statystycznej uzyskano dla wszystkich badanych antygenów.

Przeciwciała klasy IgA wykazują zdolność do przechodzenia z krwioobiegu do błon śluzowych [108]. Infekcje o etiologii związanej z bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* występują głównie w obrębie błon śluzowych układu pokarmowego, dlatego oznaczanie ich poziomu w kontekście humoralnych niedoborów odporności jest uzasadnione.

Układ odpornościowy pacjentów cierpiących na niedobory humoralne nie jest zdolny do produkcji przeciwciał lub wytwarzane przeciwciała są нефункциjonalne, przez co rozwój zakażeń nie jest efektywnie hamowany [84]. Wskutek tego, szczepienia tych pacjentów nie zapewniają im odpowiedniej ochrony przed infekcjami.

Standardowe terapie stosowane do zwalczania infekcji, jak antybiotykoterapia, nie zapewniają skutecznej ochrony pacjentom z PNO ze względu na nawracający charakter tych zakażeń. Skuteczne efekty terapeutyczne u pacjentów z niedoborami humoralnymi uzyskuje się po podaniu chorym surowicy krwi osób zdrowych, w której znajdują się przeciwciała chroniące przed rozwojem infekcji. Podawanie jednak pełnej surowicy wiąże się również z zagrożeniami ze względu na dostarczenie dużej ilości obcych białek.

Izolacja przeciwciał skierowanych na konkretny patogen pozwala znacznie ograniczyć ilość podawanego białka, co zwiększa bezpieczeństwo terapii suplementacyjnej. Wdrożenie takiej terapii nie tylko umożliwi wyleczenie pacjenta, ale również może stanowić profilaktykę przed rozwojem infekcji.

W opracowaniu preparatu immunoglobulinowego kluczowe znaczenie ma otrzymanie przeciwciał aktywnie zwalczających infekcje. Prowadzone przez nas badania wykazały, że największą wydajność w pozyskaniu przeciwciał anti-OmpC otrzymujemy przez wiązanie do złoża bakteryjnego białka OmpC. Zastosowana metoda oczyszczania białka OmpC pozwoliła na oddzielenie go od małych białek oraz od wielkocząsteczkowych agregatów. Otrzymany w ten sposób preparat białkowy wykazywał wysoką reaktywność biologiczną i immunochemiczną, którą potwierdzono w testach ELISA i Western Blot, dlatego jest dobrym antygenem do badania reaktywności przeciwciał różnych klas anti-OmpC oraz do ich izolacji z surowicy krwi.

Otrzymany preparat poliklonalnych przeciwciał anti-OmpC badano na modelu mysim. W pierwszej części doświadczenia zwierzęta immunizowano biernie przeciwciałami ludzkimi lub mysimi w jednej, dwóch lub trzech dawkach po 10 µg każda. Następnie zwierzętom została podana zawiesina pałeczek *Shigella flexneri* 3a w dawce LD₁₀₀. W pierwszym dniu po zakażeniu przeżywalność w grupach testowych (100%) była znacznie większa niż w grupie kontrolnej (40%), co sugerowało ochronny wpływ podawanych przeciwciał, ale nie potwierdziło go jednoznacznie, ponieważ w kolejnych dniach śmiertelność w grupach badanych i w grupie testowej wyrównała się.

Uzyskane rezultaty sugerowały, że dawki przeciwciał podawane zwierzętom były zbyt niskie lub przyjęta procedura postępowania, dotycząca terminu podania dawki przeciwciał w stosunku do czasu zakażenia, była nieoptymalna.

Drugą część procedur przeprowadzono z zastosowaniem dawki zakażającej LD₅₀ bakterii oraz ze zwiększoną dawką przeciwciał do 50 lub 100 µg. Podawane preparaty w poprzedniej części procedur nie wpływały negatywnie na kondycję zwierząt, dlatego

można było sądzić, że zwiększenie dawki również będzie bezpieczne, co dodatkowo potwierdziły doniesienia innych grup badaczy [41, 64].

W doświadczeniu zbadano wpływ dwóch dawek (po 50 µg lub po 100 µg) przeciwciał ludzkich oraz przeciwciał mysich na rozwój zakażenia pałeczkami *Shigella*. Wszystkie zwierzęta z grup badanych przetrwały procedurę, podczas gdy w grupie kontrolnej padło 6/10 zwierząt. 60% śmiertelności w grupie zwierząt nieimmunizowanych odpowiada dawce LD₅₀. Występujące różnice wśród grup zwierząt doświadczalnych dotyczyły zachowania zwierząt.

W pierwszej dobie od zakażenia myszy u wszystkich osobników było widać objawy infekcji, jednak u zwierząt dwóch grup (1 i 2) były one bardziej nasilone w porównaniu do zwierząt z grup 3 i 4. Według osób odpowiedzialnych za przeprowadzenie procedur i obserwację zwierząt, kondycja myszy nie kwalifikowała ich do wcześniejszego poddania eutanazji. W kolejnym dniu w grupie kontrolnej śmiertelność wzrosła do 60%, natomiast kondycja pozostałych zwierząt uległa zdecydowanej poprawie.

Otrzymane rezultaty pozwoliły w sposób jednoznaczny potwierdzić ochronne działanie izolowanych przeciwciał anti-OmpC na rozwój zakażenia pałeczkami jelitowymi. Nieznaczne różnice wśród grup zwierząt immunizowanych wynikały z podawanej dawki przeciwciał ludzkich. Myszy, którym podawano przeciwciała w dawce 100 µg miały łagodniejsze objawy w porównaniu ze zwierzętami immunizowanymi dawką 50 µg. Tego typu różnice odnotowano również w przypadku zwierząt immunizowanych mysimi przeciwciałami w odniesieniu do immunizacji zwierząt przeciwciałami ludzkimi w tej samej dawce [13].

Potwierdzenie ochronnych właściwości przeciwciał anti-OmpC pozwala na opracowanie preparatu suplementującego niedobór przeciwciał. Ponadto ze względu na homologię białek głównych enterobakterii, surowica zwierząt immunizowanych białkiem OmpC z *Shigella flexneri* 3a, była reaktywna z białkami innych gatunków *Shigella* oraz innymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* [78, 85, 132]. Reakcja krzyżowa przeciwciał anti-*Shigella* z innymi bakteriami poszerza zakres działania preparatu i zwiększa jego atrakcyjność jako potencjalnego leku.

W podsumowaniu można stwierdzić, że wyniki badań zaprezentowane podczas realizacji tematu rozprawy, a dotyczące reaktywności bakteryjnego białka OmpC, rekombinowanego białka OmpC oraz koniugatów białkowych peptyd cykliczny/liniowy-BSA z przeciwciałami surowicy ludzkiej i mysiej pozwoliły na wytypowanie antygeny o potencjalnie najszerszym zastosowaniu (Tabela 30). Reaktywność bakteryjnego natywnego białka OmpC, otrzymanego na drodze

ekstrakcji z błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a w porównaniu do innych zaproponowanych antygenów prezentuje się najlepiej.

Rekombinowane białko OmpC, podawane 3-krotnie myszom w 48-godzinnych odstępach stymulowało układ odpornościowy zwierząt do produkcji przeciwciał co potwierdzono testem ELISA (Tabela 27). Przeciwciała wytworzone na drodze immunizacji zapewniły ochronę myszy przed skutkami zakażenia ich pałeczkami *S. flexneri*.

Immunizacja białkiem natywnym również skutkowała wytworzeniem przeciwciał, które chroniły zwierzęta przed rozwojem zakażenia. Białko natywne zyskuje przewagę w zastosowaniu nad białkiem rekombinowanym ze względu na wyższy stopień rozpuszczalności w roztworach wodnych, co zwiększa potencjalne możliwości jego zastosowania.

Koniugaty białkowe na bazie peptydu cyklicznego/liniowego z białkiem nośnikowym BSA, podobnie jak natywne białko OmpC, są dobrymi kandydatami do oznaczania poziomu przeciwciał w surowicy. Koniugaty ze względu na większą ilość epitopów wiążących przypadających na jedną cząsteczkę białka niż w białku OmpC pozwalają na oznaczenie miana przeciwciał przy użyciu mniejszej ilości antygeny.

Jednak ze względu na łatwość metody izolacji, niewielkie koszty finansowe i krótki czas pozyskania, bakteryjne białko OmpC, zyskuje przewagę nad koniugatami uniwersalnością zastosowania. Białko OmpC po związaniu do złoża do chromatografii powinowactwa pozwoliło na izolację aktywnych, swoistych przeciwciał anti-OmpC. Takich efektów nie udało się uzyskać z wykorzystaniem koniugatów białkowych. Po związaniu koniugatów do złoża i procesie izolacji, uzyskany preparat nie zawierał przeciwciał. Pozwala to sądzić, że koniugaty nie są odpowiednimi antygenami do izolacji przeciwciał.

Biorąc pod uwagę całościową analizę reaktywności wybranych antygenów z przeciwciałami surowiczymi (Tabela 30), najlepszym antygenem zarówno do opracowania testu serologicznego do oznaczania pierwotnych niedoborów odporności w surowicach jak i do metody izolacji swoistych przeciwciał jest białko OmpC, pozyskane na drodze ekstrakcji z błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a i 2-stopniowego procesu oczyszczania na drodze chromatografii kolumnowej.

Antygen	Zalety	Wady
natywne białko OmpC	zastosowanie w testach ELISA i Western Blot zastosowanie w chromatografii powinowactwa koszt i szybkość pozyskania antygeny potwierdzona immunogenność po podaniu zwierzętom epitop dostępny dla przeciwciał	białko błonowe, trudno rozpuszczalne w roztworach wodnych
rekombinowane białko OmpC	zastosowanie w teście Western Blot koszt i szybkość pozyskania antygeny potwierdzona immunizacja zwierząt	zastosowanie w teście ELISA zastosowanie w chromatografii powinowactwa epitop dostępny dla przeciwciał, ale białko trudno rozpuszczalne
koniugat cykliczny/liniowy- BSA	zastosowanie w teście ELISA wiele swoistych epitopów na cząsteczce białka wiążących przeciwciała anty-OmpC	zastosowanie w teście Western Blot zastosowanie w chromatografii powinowactwa koszt i szybkość pozyskania antygeny niepotwierdzona immunizacja zwierząt

Tabela 30. Podsumowanie wyników badania reaktywności wybranych antygenów z przeciwciałami surowicy ludzkiej/mysiej.

6. Wnioski

Badania reaktywności przeciwciał anti-OmpC, obecnych w surowicach ludzkich pochodzących od ludzi zdrowych i pacjentów z PNO w różnym wieku, przeprowadzone z użyciem czterech antygenów (natywne białko OmpC pozyskane z *S. flexneri* 3a, białko OmpC rekombinowane w systemie ekspresyjnym *E.coli*, koniugat peptydu cyklicznego [GGLNRYDERYIGK]-C z BSA i koniugat peptydu liniowego GLNRYDERYIGC z BSA), zawierających minimalny epitop wiążący RYDERY oraz szczegółowa analiza uzyskanych wyników, pozwoliły na sformułowanie wniosku, że optymalnym antygenem do otrzymania swoistych przeciwciał anti-OmpC jest białko ekstrahowane z błony zewnętrznej pałeczek *S. flexneri* 3a.

Ocena uzyskanych wyników reaktywności wymienionych białek i koniugatów peptyd-BSA z przeciwciałami w warunkach *in vitro* pozwoliły na wytypowanie antygeny o wysokiej swoistości i optymalnych właściwościach fizykochemicznych. Wytypowanie najatrakcyjniejszego białka pozwoliło na udoskonalenia zasady 3R (zasada ograniczenia) w badaniach na modelu zwierzęcym, co pozwoliło na otrzymanie wiarygodnych wyników na mniejszej grupie zwierząt.

Reaktywność natywnego białka OmpC oraz koniugatów peptyd-BSA z przeciwciałami surowiczymi pacjentów PNO/NZDO wobec grup kontrolnych (dzieci i dorośli bez niedoborów odporności) pozwoliła na określenie w surowicy krwi średniego miana przeciwciał (IgA, IgG) i wykazanie statystycznie znamiennej różnicy w ich poziomie między grupami. Jest to podstawa do opracowania testu serologicznego do oznaczania niedoborów swoistych przeciwciał (SAD).

Wykazano, że w surowicy krwi dzieci z rozpoznanymi pierwotnymi niedoborami immunologicznymi (PNO) oraz dzieci z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych (NZDO), występują niższe średnie miana przeciwciał klasy IgA w porównaniu z ich poziomem w grupie kontrolnej. Potwierdzenie tego faktu stanowi podstawę do opracowania terapeutycznego suplementacyjnego niedobory przeciwciał. Aplikacyjność tej tezy potwierdzają wyniki protekcyjne immunizacji biernej myszy przeciwciałami anti-OmpC wobec zakażenia pałeczkami *Shigella flexneri* 3a.

Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym potwierdziły potencjał immunizacyjny bakteryjnego białka OmpC oraz rekombinowanego białka OmpC. W wyniku immunizacji myszy tymi preparatami zaobserwowano znaczny wzrost miana przeciwciał anti-OmpC, co stanowiło skuteczną (100%/80%) ochronę zwierząt przed

zakażeniem pałeczkami *S. flexneri* 3a. Zaprezentowane wyniki podkreślają właściwości białka OmpC również jako skutecznego i bezpiecznego antygeny szczepionkowego o udowodnionym działaniu immunostymulacyjnym,

Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań:

- 1) wnioskuje się możliwość wykorzystania białka OmpC do testów immunoenzymatycznych, celem opracowania odpowiedniego testu serologicznego do oznaczania swoistych przeciwciał anti-OmpC, których niedobór w surowicy wskazuje na humoralne niedobory odporności, a brak statystycznie istotnych różnic w poziomach przeciwciał anti-OmpC w zależności od wieku czy płci pacjentów, pozwala na ocenę niedoborów bez uwzględniania tych cech,
- 2) wnioskuje się także możliwość zastosowania białka OmpC do immobilizacji na złożu do chromatorafii powinowactwa, celem izolacji swoistych przeciwciał anti-OmpC, stanowiących potencjalny terapeutyk do suplementacji w przypadku pierwotnych humoralnych niedoborów odporności,
- 3) stwierdza się, że analiza statystyczna otrzymanych wyników mian przeciwciał anti-OmpC klas IgG i IgA surowicy ludzkiej wykazała znaczne różnice w poziomie przeciwciał klasy IgA między badanymi grupami, co sugeruje oparcie testu na tej klasie przeciwciał,
- 4) stwierdza się ponadto, że określenie właściwości immunostymulacyjnych i ochronnych białka OmpC (na modelu mysim), uwiarygodniło zasadność i bezpieczeństwo stosowania takiej terapii. Potwierdzony na modelu zwierzęcym ochronny wpływ preparatu swoistych przeciwciał anti-OmpC (immunizacja bierna) na zakażenia o etiologii *Shigella flexneri* pozwala na walkę z patogenami antybiotykoopornymi,
- 5) stwierdza się także, że wysoki stopień homologii struktur białek głównych błony zewnętrznej pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* pozwala sądzić, że podanie przeciwciał anti-OmpC *S. flexneri* ochroni pacjentów z PNO przed rozwojem zakażenia nie tylko pałeczkami *Shigella*, ale również zapewni im ochronę przed rozwojem zakażenia wywołanego przez innych przedstawicieli tej grupy bakterii,

7. Bibliografia

- [1] Adamus G., Mulczyk M., Witkowska D., Romanowska E.: Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* spp. *Infect. Immun.*, 1980; 30: 321–324;
- [2] Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., Conley M.E., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Gaspar H.B., Holland S.M., Klein C., Nonoyama S., Ochs H.D., Oksenhendler E., Picard C., et al.: Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 162: 1-33;
- [3] Arcidiacono S., Butler M.M., Mello C.M.: A rapid selective extraction procedure for the outer membrane protein (OmpF) from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 2002; 25: 134–137;
- [4] Babior B.M., Takeuchi C., Ruedi J., Gutierrez A., Wentworth P.: Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003; 100: 3031–3034;
- [5] Ballou M.: Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002; 109: 581–591;
- [6] Basile N., Danielian S., Oleastro M., Rosenzweig S., Prieto E., Rossi J., Roy A., Zelazko M.: Clinical and molecular analysis of 49 patients with X-linked agammaglobulinemia from a single center in Argentina. *J. Clin. Immunol.*, 2009; 29: 123–129;
- [7] Bebbington C., Yarranton G.: Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008; 19: 613–619;
- [8] Bondos S.E., Bicknell A.: Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal. Biochem.*, 2003; 316: 223–231;
- [9] Bonilla F.A., Geha R.S.: 12. Primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111: S571–S581;
- [10] Bonilla F.A., Geha R.S.: Immunodeficiencies caused by B cell defects. *Mol. Biol. B Cells Elsevier Acad. Press San Diego CA*, 2004; 403–416;
- [11] Bonilla F.A., Geha R.S.: 2. Update on primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 117: S435–S441;
- [12] Both L., Banyard A.C., van Dolleweerd C., Horton D.L., Ma J.K., Fooks A.R.: Passive immunity in the prevention of rabies. *Lancet Infect. Dis.*, 2012; 12: 397–407;
- [13] Briles D.E., David E., et al.: Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *The Journal of infectious diseases*, 2000; 182.6: 1694–1701;
- [14] CastilloKeller M., Misra R., Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. *Journal of bacteriology*, 2003; 185.1: 148-154;

- [15] Celińska-Löwenhoff M., Musiał J.: Niedobory odporności humoralnej u osób dorosłych. *Alerg. Astma Immunol.*, 2014; 19(4): 202–209;
- [16] Champi C.: Primary immunodeficiency disorders in children: prompt diagnosis can lead to lifesaving treatment. *J. Pediatr. Health Care Off. Publ. Natl. Assoc. Pediatr. Nurse Assoc. Pract.*, 2002; 16: 16–21;
- [17] Chapel H.: Classification of primary immunodeficiency diseases by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012; 168: 58–59;
- [18] Chapel H., Cunningham-Rundles C.: Update in understanding Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br. J. Haematol.*, 2009; 145: 709–727;
- [19] Chapel H., Puel A., von Bernuth H., Picard C., Casanova J.L.: *Shigella sonnei* Meningitis Due to Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-4 Deficiency: First Association with a Primary Immune Deficiency. *Clin. Infect. Dis.*, 2005; 40: 1227–1231;
- [20] Christensen H.O., Fandrup S.: *Inborn Immune Deficiency: A Handbook for Parents, Patients, Nurses and Doctors*. Immun Defekt Foreningen, 2014;
- [21] Conley M.E., Dobbs A.K., Farmer D.M., Kilic S., Paris K., Grigoriadou S., Coustan-Smith E., Howard V., Campana D.: Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009; 27: 199–227;
- [22] Conti S., Magliani W., Arseni S., Dieci E., Frazzi R., Salati A., Varaldo P., Polonelli L.: *In vitro* activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol. Med.*, 2000; 6: 613–619;
- [23] Cooper M.A., Pommering T.L., Koranyi K.: Primary immunodeficiencies. *Am. Fam. Physician*, 2003; 68: 2001–2008;
- [24] Cossart P., Sansonetti P.J.: Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 2004; 304: 242–248;
- [25] Cuccherini B., Chua K., Gill V., Weir S., Wray B., Stewart D., Nelson D., Fuss I., Strober W.: Bacteremia and skin/bone infections in two patients with X-linked agammaglobulinemia caused by an unusual organism related to *Flexispira/Helicobacter* species. *Clin. Immunol.*, 2000; 97: 121–129;
- [26] Cultrera R., Seraceni S., Germani R., Contini C.: Molecular evidence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. *BMC Infect. Dis.*, 2006; 6: 166;
- [27] Cunningham-Rundles C.: Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2008; 28: 42–45;
- [28] Cunningham-Rundles C., Bodian C.: Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin. Immunol.*, 1999; 92: 34–48;

- [29] Czinn S.J., Cai A., Nedrud J.G.: Protection of germ-free mice from infection by *Helicobacter felis* after active oral or passive IgA immunization. *Vaccine*, 1993; 11: 637–642;
- [30] Czyżewska-Buczyńska A., Lewandowicz-Uszyńska A., Jankowski A.: IgA istotny element układu odporności–wybrane zagadnienia IgA, an essential part of the immune system: Selected issues. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 38–47;
- [31] DeVries A.S., Harper J., Murray A., Lexau C., Bahta L., Christensen J., Cebelinski E., Fuller S., Kline S., Wallace G.S., et al.: Vaccine-derived poliomyelitis 12 years after infection in Minnesota. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 364: 2316–2323;
- [32] Dębińska A., Boznański A.: Rola receptorów Toll-podobnych (TLR) w patogenezie schorzeń alergicznych-gdzie leży prawda? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 230–237;
- [33] Dropulic L.K., Cohen J.I.: Severe viral infections and primary immunodeficiencies. *Clin. Infect. Dis.*, 2011; 53: 897–909;
- [34] Dye B.A., Choudhary K., Shea S., Papapanou P.N.: Serum antibodies to periodontal pathogens and markers of systemic inflammation. *J. Clin. Periodontol.*, 2005; 32: 1189–1199;
- [35] Faria-Neto J.R., Chyu K.Y., Li X., Dimayuga P.C., Ferreira C., Yano J., Cercek B., Shah P.K.: Passive immunization with monoclonal IgM antibodies against phosphorylcholine reduces accelerated vein graft atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Atherosclerosis*, 2006; 189: 83–90;
- [36] Franz A., Webster A., Furr P., Taylor-Robinson D.: Mycoplasmal arthritis in patients with primary immunoglobulin deficiency: clinical features and outcome in 18 patients. *Br. J. Rheumatol.*, 1997; 36: 661–668;
- [37] Fried A.J., Bonilla F.A.: Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009; 22: 396–414;
- [38] Furr P., Taylor-Robinson D., Webster A.: Mycoplasmas and ureaplasmas in patients with hypogammaglobulinaemia and their role in arthritis: microbiological observations over twenty years. *Ann. Rheum. Dis.*, 1994; 53: 183–187;
- [39] Gerrard J., Alfredson D., Smith I.: Recurrent bacteremia and multifocal lower limb cellulitis due to *Helicobacter*-like organisms in a patient with X-linked hypogammaglobulinemia. *Clin. Infect. Dis.*, 2001; 33: e116–e118;
- [40] Girard M.P., Steele D., Chaignat C.L., Kieny M.P.: A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*, 2006; 24: 2732–2750;
- [41] Goyette-Desjardins G., Lacouture S., Auger J.P., Roy R., Gottschalk M., Segura M.: Characterization and protective activity of monoclonal antibodies directed against *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide obtained using a glycoconjugate. *Pathogens*, 2019; 8(3): 139;

- [42] Granados E.L., Porpiglia A.S., Hogan M.B., Matamoros N., Krasovec S., Pignata C., Smith C., Hammarstrom L., Bjorkander J., Belohradsky B.H., et al.: Clinical and molecular analysis of patients with defects in μ heavy chain gene. *J. Clin. Invest.*, 2002; 110(7): 1029–1035;
- [43] Griffith L.M., Cowan M.J., Notarangelo L.D., Puck J.M., Buckley R.H., Candotti F., Conley M.E., Fleisher T.A., Gaspar H.B., Kohn D.B., et al.: Improving cellular therapy for primary immune deficiency diseases: recognition, diagnosis, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 124: 1152–1160;
- [44] Gruda M.C., Rugeberg K.G., O’Sullivan P., Guliashvili T., Scheirer A.R., Golobish T.D., Capponi V.J., Chan P.P.: Broad adsorption of sepsis-related PAMP and DAMP molecules, mycotoxins, and cytokines from whole blood using CytoSorb® sorbent porous polymer beads. *PloS One*, 2018; 13(1): e0191676;
- [45] Grzelak L., Velay A., Madec Y., Gallais F., Staropoli I., Schmidt-Mutter C., Wendling M.J., Meyer N., Planchais C., Rey D., et al.: Sex differences in the evolution of neutralizing antibodies to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Infect. Dis.*, 2021; 224: 983–988;
- [46] Hernandez P.A., Gorlin R.J., Lukens J.N., Taniuchi S., Bohinjec J., Francois F., Klotman M.E., Diaz G.A.: Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.*, 2003; 34: 70–74;
- [47] Hirayama K., Akashi S., Furuya M., Fukuhara K. ichi: Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 173: 639–646;
- [48] Jakóbiśiak M., Lasek W., Stokłosa T., Gołab J.: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2020;
- [49] Jarzab A., Witkowska D., Szostko B., Hirnle L., Gamian A.: Potential carrier for conjugate vaccines: OMP-38 protein from *Shigella flexneri* 3a – isolation and purification strategies. *Sepsis*, 2011; 4: 39–45;
- [50] Jarzab A., Górska-Frączek S., Rybka J., Witkowska D.: *Enterobacteriaceae* infection-diagnosis, antibiotic resistance and prevention. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 55–72;
- [51] Jarzab A., Witkowska D., Ziomek E., Dąbrowska A., Szewczuk Z., Gamian A.: *Shigella flexneri* 3a outer membrane protein C epitope is recognized by human umbilical cord sera and associated with protective activity. *PloS One*, 2013; 8(8): 1–10;
- [52] Jarzab A., Witkowska D., Ziomek E., Setner B., Czajkowska A., Dorot M., Szewczuk Z., Gamian A.: Cyclic OmpC peptidic epitope conjugated to tetanus toxoid as a potential vaccine candidate against shigellosis. *Vaccine*, 2018; 36(31): 4641–4649;
- [53] Jesenak M., Banovcin P., Jesenakova B., Babusikova E.: Pulmonary manifestations of primary immunodeficiency disorders in children. *Front. Pediatr.*, 2014; 2: 77: 1–13;
- [54] Johnston S.L.: Clinical Immunology Review Series: An approach to the patient with recurrent superficial abscesses. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008; 152: 397–405;

- [55] Kaufmann G.F., Park J., Mee J.M., Ulevitch R.J., Janda K.D.: The *quorum quenching* antibody RS2-1G9 protects macrophages from the cytotoxic effects of the *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing* signalling molecule N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone. *Mol. Immunol.*, 2008; 45: 2710–2714;
- [56] Kim S.K., Wu X., Ragupathi G., Gathuru J., Koide F., Cheung N.K., Panageas K., Livingston P.O.: Impact of minimal tumor burden on antibody response to vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2011; 60: 621–627;
- [57] Kotloff K.L., Nataro J.P., Blackwelder W.C., Nasrin D., Farag T.H., Panchalingam S., Wu Y., Sow S.O., Sur D., Breiman R.F., et al.: Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*, 2013; 382: 209–222;
- [58] Kotyla P.J.: Pierwotne niedobory odpornościowe – wstęp do chorób autoimmunizacyjnych. *Forum Reumatol.*, 2015; 1: 30–37;
- [59] Krause J.C., Ghandil P., Chrabieh M., Casanova J.L., Picard C., Puel A., Creech C.B.: Very late-onset group B *Streptococcus meningitis*, sepsis, and systemic shigellosis due to interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *Clin. Infect. Dis.*, 2009; 49: 1393–1396;
- [60] Kravchenko V.V., Kaufmann G.F., Mathison J.C., Scott D.A., Katz A.Z., Grauer D.C., Lehmann M., Meijler M.M., Janda K.D., Ulevitch R.J.: Modulation of gene expression via disruption of NF- κ B signaling by a bacterial small molecule. *Science*, 2008; 321: 259–263;
- [61] Kutik S., Stojanovski D., Becker L., Becker T., Meinecke M., Krüger V., Prinz C., Meisinger C., Guiard B., Wagner R., et al.: Dissecting membrane insertion of mitochondrial β -barrel proteins. *Cell*, 2008; 132: 1011–1024;
- [62] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680–685;
- [63] LaRocca T.J., Katona L.I., Thanassi D.G., Benach J.L.: Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever *Borrelia* resides in its variable region. *J. Immunol.*, 2008; 180: 6222–6228;
- [64] Lee C.C., Southgate R., Jiao C., Gersz E., Owen J.R., Kates S.L., Beck C.A., Xie C., Daiss J.L., Post V., et al.: Deriving a dose and regimen for anti-glucosaminidase antibody passive-immunization for patients with *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur. Cell. Mater.*, 2020; 39: 96–107;
- [65] Lehman H.K.: Autoimmunity and Immune Dysregulation in Primary Immune Deficiency Disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2015; 15(9): 53;
- [66] Lewandowicz-Uszyńska A.: Preparaty immunoglobulin: wskazania kliniczne, mechanizmy działania, rodzaje preparatów gammaglobulin. W: Leczenie substytucyjne preparatami immunoglobulin w pierwotnych niedoborach odporności. red.: A. Lewandowicz-Uszyńska, B. Pietrucha, A. Szaflarska. *Kołaż*, Warszawa 2012, 51–57;

- [67] Lewandowicz-Uszyńska A., Pasternak G., Kuraszewicz A., Prościak M., Gul K., Lewicka P., Pirogowicz I.: Pierwotne niedobory odporności u dzieci – obraz kliniczny. W: Dziecko - jego zdrowie i jego środowisko : objawy alarmowe w pediatrii z perspektywy gastroenterologa, ginekologa i immunologa klinicznego. red.: I. Pirogowicz, B. Iwańczak, A. Lewandowicz-Uszyńska. Wrocławskie Wydawnictwo Naukowe Atla 2, Wrocław 2017, 13–21;
- [68] Lewandowicz-Uszyńska A., Szaflarska A., Pietrucha B., Wójcik J., Pochylczuk R., Kuśmirek B.: Standards of treatment with subcutaneous immunoglobulins in primary immunodeficiencies - guidelines for doctors and nurses drawn up by three immunology centers in Poland. W: red.: A. Etzioni, E. Gambineri. Italy 2013, 123–125;
- [69] Lewicka P., Lewandowicz-Uszyńska A.: Szczepienia ochronne u dzieci z pierwotnymi i wtórnymi niedoborami odporności. W: Dziecko – jego zdrowie i jego środowisko : zaburzenia rozwoju fizycznego dzieci w różnych aspektach klinicznych. red.: I. Pirogowicz, A. Lewandowicz-Uszyńska, B. Iwańczak. Wrocławskie Wydawnictwo Naukowe Atla 2, Wrocław 2017, 103–115;
- [70] Li C., Akuta T., Nakagawa M., Sato T., Shibata T., Maruyama T., Okumura C., Kurosawa Y., Arakawa T.: Agarose native gel electrophoresis for characterization of antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020; 151: 885–890;
- [71] Lis J., Jarzab A., Witkowska D.: Rola mimikry molekularnej w etiologii schorzeń o charakterze autoimmunizacyjnym (Molecular mimicry in the etiology of autoimmune diseases). *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 475–491;
- [72] Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., Brandtzaeg P.: The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.*, 2008; 1: 11–22;
- [73] Madkaikar M., Mishra A., Ghosh K.: Diagnostic approach to primary immunodeficiency disorders. *Indian Pediatr.*, 2013; 50: 579–586;
- [74] Mani S., Wierzbę T., Walker R.I.: Status of vaccine research and development for *Shigella*. *Vaccine*, 2016; 34: 2887–2894;
- [75] March J.C., Bentley W.E.: *Quorum sensing* and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004; 15: 495–502;
- [76] Mazińska B., Hryniewicz W.: Antybiotykooporność: przyczyny i konsekwencje. *Postępy Mikrobiologii*, 2020; 59: 3: 249–257;
- [77] McCusker C., Warrington R.: Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2011; 7.1: 1–8;
- [78] Milliana A., Noorhamdani A., Poeranto S., Handono K., Prawiro S.R., Fitrianiingsih A.A., Rachma L.N.: Antibodies against *Shigella flexneri* adhesion molecule outer membrane protein (OMP) can cross-react with OMPs of some *Shigella* species. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2017; 16: 255–261;
- [79] Miyairi S., Tateda K., Fuse E.T., Ueda C., Saito H., Takabatake T., Ishii Y., Horikawa M., Ishiguro M., Standiford T.J., et al.: Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine

lactone–protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J. Med. Microbiol.*, 2006; 55: 1381–1387;

[80] Miyashita H., Honda T., Maekawa T., Takahashi N., Aoki Y., Nakajima T., Tabeta K., Yamazaki K.: Relationship between serum antibody titres to *Porphyromonas gingivalis* and hs-CRP levels as inflammatory markers of periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, 2012; 57: 820–829;

[81] Molina D. M., Lundbäck A. K., Niegowski D. et al., Expression and purification of the recombinant membrane protein YidC: A case study for increased stability and solubility. *Protein expression and purification*, 2008; 62.1: 49-52;

[82] Mulczyk M., Adamus G., Witkowska D.: Protective properties of peptidoglycan associated protein of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 1984; 32: 631–635;

[83] Mulczyk M., Adamus G., Witkowska D., Romanowska E.: Studies on virulence of *Shigella flexneri*. Protective effect of outer membrane proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 1981; 29: 85–90;

[84] Naporowski P., Witkowska D., Lewandowicz-Uszyńska A., Gamian A.: Zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze towarzyszące pierwotnym niedoborom odporności manifestacją zaburzeń procesów immunologicznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2018; 72: 557–572;

[85] Nosrati M., Hajizade A., Nazarian S., Amani J., Vansofla A.N., Tarverdzideh Y.: Designing a multi-epitope vaccine for cross-protection against *Shigella* spp: an immunoinformatics and structural vaccinology study. *Mol. Immunol.*, 2019; 116: 106–116;

[86] Notarangelo L.D.: Primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 125: S182–194;

[87] Notarangelo L.D., Lanzi G., Peron S., Durandy A.: Defects of class-switch recombination. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 117: 855–864;

[88] Ochs H.D., Smith C.E., Puck J.M.: Primary immunodeficiency diseases: a molecular & cellular approach. Oxford University Press, 2006;

[89] Oliveira J.B., Fleisher T.A.: Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 125: S297–S305;

[90] Oliveira J.B., Notarangelo L.D., Fleisher T.A.: Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2008; 8: 499–509;

[91] Pachathundikandi S., Backert S.: Heptose 1, 7-bisphosphate directed TIFA oligomerization: a novel PAMP-recognizing signaling platform in control of bacterial infections. 2018; 154.4: 778–783;

[92] Paessler M., Levinson A., Patel J.B., Schuster M., Minda M., Nachamkin I.: Disseminated *Mycoplasma orale* infection in a patient with common variable immunodeficiency syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002; 44: 201–204;

[93] Page M., Thorpe R.: Analysis of IgG fractions by electrophoresis. *Protein Protoc. Handb.*, 2009; 1775–1777;

- [94] Park J., Jagasia R., Kaufmann G.F., Mathison J.C., Ruiz D.I., Moss J.A., Meijler M.M., Ulevitch R.J., Janda K.D.: Infection control by antibody disruption of bacterial *quorum sensing* signaling. *Chem. Biol.*, 2007; 14: 1119–1127;
- [95] Pawlowski A., Källenius G., Svenson S.B.: A new method of non-cross-linking conjugation of polysaccharides to proteins via thioether bonds for the preparation of saccharide-protein conjugate vaccines. *Vaccine*, 1999; 17: 1474–1483;
- [96] Picard C., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., Conley M.E., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Holland S.M., Klein C., Nonoyama S., Ochs H.D., Oksenhendler E., Puck J.M., Sullivan K.E., at al.: Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.*, 2015; 35: 696–726;
- [97] Pietrucha B., Heropolitańska-Pliszka E., Klaudel-Dreszler M., Wolska-Kusnierz B., Matosek A., Bernatowska E.: Wybrane zagadnienia z immunologii klinicznej – niedobory przeciwciał i niedobory komórkowe (część I). *Pediatr. Pol.*, 2011; 86: 548–558;
- [98] Plebani A., Soresina A., Rondelli R., Amato G.M., Azzari C., Cardinale F., Cazzola G., Consolini R., De Mattia D., Dell’Erba G., at al.: Clinical, immunological, and molecular analysis in a large cohort of patients with X-linked agammaglobulinemia: an Italian multicenter study. *Clin. Immunol.*, 2002; 104: 221–230;
- [99] Quartier P., Debré M., De Blic J., de Sauevzac R., Sayegh N., Jabado N., Haddad E., Blanche S., Casanova J.L., Smith C.E., at al.: Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J. Pediatr.*, 1999; 134: 589–596;
- [100] Quartier P., Foray S., Casanova J.L., Hau-Rainsard I., Blanche S., Fischer A.: Enteroviral meningoencephalitis in X-linked agammaglobulinemia: intensive immunoglobulin therapy and sequential viral detection in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2000; 19: 1106–1108;
- [101] Quinti I., Pierdominici M., Marziali M., Giovannetti A., Donnanno S., Chapel H., Bjorkander J., Aiuti F., Safety E.S.G. for the S. of I., at al.: European surveillance of immunoglobulin safety-results of initial survey of 1243 patients with primary immunodeficiencies in 16 countries. *Clin. Immunol.*, 2002; 104: 231–236;
- [102] Rajae A., Barnett R., Cheadle W.G.: Pathogen and danger associated molecular patterns and the cytokine response in Sepsis. *Surg. Infect.*, 2018; 19.2: 107-116;
- [103] Ramel D., Lagarrigue F., Pons V., Mounier J., Dupuis-Coronas S., Chicanne G., Sansonetti P.J., Gaits-Iacovoni F., Tronchère H., Payrastre B.: *Shigella flexneri* infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling. *Sci Signal*, 2011; 4(191): ra61;
- [104] Razvi S., Schneider L., Jonas M.M., Cunningham-Rundles C.: Outcome of intravenous immunoglobulin-transmitted hepatitis C virus infection in primary immunodeficiency. *Clin. Immunol.*, 2001; 101: 284–288;

- [105] Rigel N.W., Silhavy T.J.: Making a beta-barrel: assembly of outer membrane proteins in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012; 15: 189–193;
- [106] Roy C.J., Van Slyke G., Ehrbar D., Bornholdt Z.A., Brennan M.B., Campbell L., Chen M., Kim D., Mlakar N., Whaley K.J., et al.: Passive immunization with an extended half-life monoclonal antibody protects *Rhesus macaques* against aerosolized ricin toxin. *Npj Vaccines*, 2020; 5: 1–8;
- [107] Sanford C.A., Jong E.C., Pottinger P.S.: *The Travel and Tropical Medicine Manual E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2016;
- [108] Sano, Kaori, et al.: SARS-CoV-2 vaccination induces mucosal antibody responses in previously infected individuals. *Nature Communications*, 2022; 13: 5135: 1–7;
- [109] Schnaitman C.A.: Outer membrane proteins of *Escherichia coli* III. Evidence that the major protein of *Escherichia coli* O111 outer membrane consists of four distinct polypeptide species. *J. Bacteriol.*, 1974; 118: 442–453;
- [110] Shearer J., Jefferies D., Khalid S.: Outer membrane proteins OmpA, FhuA, OmpF, EstA, BtuB, and OmpX have unique lipopolysaccharide fingerprints. *J. Chem. Theory Comput.*, 2019; 15: 2608–2619;
- [111] Sochocka M.: Rozpoznawanie patogenów przez wrodzony system odporności Recognition of pathogens by innate immunity. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 676–687;
- [112] Soloveva T., Likhatskaya G., Khomenko V., Guzev K., Kim N., Bystritskaya E., Novikova O., Stenkova A., Rakin A., Isaeva M.: The impact of length variations in the L2 loop on the structure and thermal stability of non-specific porins: The case of OmpCs from the *Yersinia pseudotuberculosis* complex. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, 2018; 1860: 515–525;
- [113] Sordet C., Cantagrel A., Schaefferbeke T., Sibia J.: Bone and joint disease associated with primary immune deficiencies. *Joint Bone Spine*, 2005; 72: 503–514;
- [114] Stojićević I., Dimitrijević L., Dovezenski N., Živković I., Petrušić V., Marinković E., Inić-Kanada A., Stojanović M.: Tetanus toxoid purification: Chromatographic procedures as an alternative to ammonium-sulphate precipitation. *J. Chromatogr. B*, 2011; 879: 2213–2219;
- [115] Strober W., Sneller M.: IgA deficiency. *Ann. Allergy*, 1991; 66: 363–375;
- [116] Takahashi T., Ellingson M.K., Wong P., Israelow B., Lucas C., Klein J., Silva J., Mao T., Oh J.E., Tokuyama M., et al.: Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*, 2020; 588: 315–320;
- [117] Tamm L.K., Hong H., Liang B.: Folding and assembly of β -barrel membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, 2004; 1666: 250–263;
- [118] Tokuda K., Nishi J., Miyahara H., Sarantuya J., Iwashita M., Kamenosono A., Hizukuri K., Wakimoto N., Yoshinaga M.: Relapsing cellulitis associated with *Campylobacter coli* bacteremia in an agammaglobulinemic patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2004; 23: 577–579;

- [119] Vale A.M., Schroeder H.W.: Clinical consequences of defects in B-cell development. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 125: 778–787;
- [120] Vergalli J., Bodrenko I.V., Masi M., Moynié L., Acosta-Gutiérrez S., Naismith J.H., Davin-Regli A., Ceccarelli M., Van den Berg B., Winterhalter M., et al.: Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020; 18.3: 164-176;
- [121] Wang L., Ning S.: “Toll-free” pathways for production of type I interferons. *AIMS Allergy Immunol.*, 2017; 1(3): 143–163;
- [122] Wang X., Guan Q., Wang X., Teng D., Mao R., Yao J., Wang J.: Paving the way to construct a new vaccine against *Escherichia coli* from its recombinant outer membrane protein C via a murine model. *Process Biochem.*, 2015; 50: 1194–1201;
- [123] Wentworth P., Wentworth A.D., Zhu X., Wilson I.A., Janda K.D., Eschenmoser A., Lerner R.A.: Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003; 100: 1490–1493;
- [124] Winkelstein J.A., Marino M.C., Lederman H.M., Jones S.M., Sullivan K., Burks A.W., Conley M.E., Cunningham-Rundles C., Ochs H.D.: X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine (Baltimore)*, 2006; 85: 193–202;
- [125] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Humoral response in mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 1986; 34: 499–504;
- [126] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Immunogenic and protective properties of outer membrane proteins of *Hafnia alvei*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 1990; 38: 387–393;
- [127] Witkowska D., Mleczo J., Mulczyk M.: Transfer of immunity by means of spleen cells from mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 1985; 33: 629–635;
- [128] Witkowska D., Mulczyk M., Adamus G.: Studies on specificity of protection induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 1985; 33: 625–628;
- [129] Witkowska D.: Udział białek ściany komórkowej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w patogenności i odporności przeciwbakteryjnej. Rozprawa na stopień doktora habilitowanego, IITD im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu, 2007; Wydawnictwo IITD im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu; ISBN 83-914239-4-8;
- [130] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 176–199;
- [131] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Defensyny i katelicyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. Defensins and cathelicidins as natural peptide antibiotics. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 694–707;

- [132] Witkowska D., Masłowska E., Staniszevska M., Szostko B., Jankowski A., Gamian A.: Enterobacterial 38-kDa outer membrane protein is an age-dependent molecular marker of innate immunity and immunoglobulin deficiency as results from its reactivity with IgG and IgA antibody. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006; 48(2): 205–214;
- [133] Wood P., Stanworth S., Burton J., Jones A., Peckham D., Green T., Hyde C., Chapel H.: Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007; 149(3): 410–423;
- [134] Yamada H., Matsumura C., Yamada K., Teshima K., Hiroshima T., Kinoshita M., Suzuki S., Kakehi K.: Combination of SDS-PAGE and intact mass analysis for rapid determination of heterogeneities in monoclonal antibody therapeutics. *Electrophoresis*, 2017; 38: 1344–1352;
- [135] Yazdani R., Abolhassani H., Asgardoon M., Shaghghi M., Modaresi M., Azizi G., Aghamohammadi A.: Infectious and noninfectious pulmonary complications in patients with primary immunodeficiency disorders. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2017; 27: 213–224;
- [136] Zeng F., Dai C., Cai P., Wang J., Xu L., Li J., Hu G., Wang Z., Zheng F., Wang L.: A comparison study of SARS-CoV-2 IgG antibody between male and female COVID-19 patients: a possible reason underlying different outcome between sex. *J. Med. Virol.*, 2020; 92: 2050–2054;

Wykaz tabel

Tabela 1. Charakterystyka zasadniczych cech i występujących różnic między odpornością wrodzoną i nabytą.

Tabela 2. Kliniczne objawy pierwotnych niedoborów odporności u dzieci (wg Fundacji Jeffey'a Modella z Grupą Ekspertów) (<http://www.info4pi.org/>) i u dorosłych (wg WHO).

Tabela 3. Klasyfikacja i przykłady pierwotnych niedoborów odporności (PNO) opracowane na podstawie informacji Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych.

Tabela 4. Patogeny będące czynnikami etiologicznymi zakażeń występujących u pacjentów z PNO.

Tabela 5. Najważniejsze bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Tabela 6. Objętości roztworów stosowanych do przygotowania żeli poliakrylamidowych o odpowiedniej procentowości.

Tabela 7. Schemat dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami natywnego i rekombinowanego białka OmpC z użyciem zakażenia myszy dawką LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 5 osobników,

Tabela 8. Schemat dootrzewnowej, biernej immunizacji myszy swoistymi przeciwciałami anti-OmpC, izolowanymi z surowicy ludzkiej/mysiej, stosowany w doświadczeniu modelowym z użyciem dawki zakażającej LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 5 osobników.

Tabela 9. Schemat biernej immunizacji myszy swoistymi przeciwciałami anti-OmpC, uzyskanymi z surowicy ludzkiej/mysiej, stosowany w doświadczeniu modelowym z użyciem dawki zakażającej LD₅₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 10 osobników.

Tabela 10. Wydajność oczyszczania białka OmpC na poszczególnych etapach oraz całkowita wydajność procesu.

Tabela 11. Wydajność procesu izolacji przeciwciał anti-OmpC z surowicy ludzkiej krwi na kolumnie ze złożem Sepharose CL-4B–OmpC.

Tabela 12. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał anti-OmpC klasy IgA oznaczonych w surowicach badanych grup.

Tabela 13. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgA anty-koniugat cykliczny/BSA oznaczonych w surowicach badanych grup.

Tabela 14. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgA anty-koniugat liniowy/BSA, wyznaczonych w surowicach badanych grup.

Tabela 15. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA, oznaczone w teście ELISA wobec trzech antygenów (białko OmpC, koniugat cykliczny-BSA, koniugat liniowy-BSA), i obecne w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych.

Tabela 16. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgA, oznaczone w surowicach badanych grup wobec trzech użytych w teście ELISA antygenów (białko OmpC, koniugat cykliczny/BSA, koniugat liniowy/BSA) zanalizowane z uwzględnieniem podziału na płeć.

Tabela 17. Tabela przedstawia wartości P świadczące o istotności statystycznej. Wynik $P < 0,05$ jest wynikiem istotnym statystycznie ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Tabela 18. Przedstawienie wartości współczynników korelacji r Pearsona z analizy zależności miana swoistych przeciwciał klasy IgA od wieku zdrowych dzieci lub pacjentów PNO (korelacja słaba r od -0,5 do 0,0 oraz 0,0 do 0,5, korelacja silna r od -1,0 do -0,5 oraz od 0,5 do 1,0). Wartość $P < 0,05$ świadczy o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Tabela 19. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgG anty-OmpC wyznaczane między badanymi grupami.

Tabela 20. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgG anty-koniugat cykliczny/BSA oznaczonych w surowicach badanych grup.

Tabela 21. Wartości P świadczące o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$) średnich mian przeciwciał klasy IgG anty-koniugat liniowy/BSA oznaczonych w surowicach badanych grup.

Tabela 22. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, oznaczone wobec trzech antygenów użytych w teście ELISA (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA).

Tabela 23. Zestawienie uśrednionego miana swoistych przeciwciał klasy IgG, określonego wobec trzech antygenów (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA) oznaczonego w surowicach badanych grup z uwzględnieniem liczby i płci badanych.

Tabela 24. Przedstawienie wartości P świadczącej o istotności statystycznej. Wynik $P < 0,05$ jest wynikiem istotnym statystycznie ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Tabela 25. Zestawienie wartości współczynników korelacji r Pearsona z analizy zależności miana swoistych przeciwciał klasy IgG, określonego dla trzech antygenów (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA), od wieku pacjentów (korelacja słaba r od -0,5 do 0,0 oraz 0,0 do 0,5, korelacja silna r od -1,0 do -0,5 oraz od 0,5 do 1,0). Wartość P świadczy o istotności statystycznej ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Tabela 26. Zestawienie wyników uzyskanych po immunizacji myszy preparatami natywnego i rekombinowanego białka OmpC i po zakażeniu zwierząt dawką LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 5 osobników.

Tabela 27. Zestawienie oznaczonych testem ELISA poziomów przeciwciał anti-OmpC klasy IgM i IgG w surowicach myszy kontrolnych (gr. 1), myszy immunizowanych natywnym (gr. 2) i rekombinowanym (gr. 3) białkiem OmpC.

Tabela 28. Zestawienie wyników uzyskanych po biernej immunizacji myszy preparatami ludzkich lub mysich przeciwciał anti-OmpC *S. flexneri* 3a i zakażeniu zwierząt dawką LD₁₀₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 5 osobników.

Tabela 29. Zestawienie wyników uzyskanych po biernej immunizacji myszy preparatami ludzkich lub mysich przeciwciał anti-OmpC *S. flexneri* 3a i zastosowaniu zakażenia zwierząt dawką LD₅₀ bakterii. W każdej grupie zwierząt było 10 osobników.

Tabela 30. Podsumowanie wyników badania reaktywności wybranych antygenów z przeciwciałami surowicy ludzkiej/mysiej.

Wykaz rycin

Rycina 1. Budowa osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych.

Rycina 2. Fragment poriny bakteryjnej zawierającej antyrównoległe β -zwoje oraz zakręty β .

Rycina 3. Podsumowanie badań bioinformatycznych nad OmpC. A – rozmieszczenie epitopów na powierzchni modelu 3D OmpC *Shigella flexneri* 3a; epitopy od 1 do 5 reprezentują pętle błony zewnętrznej (1– pętla II, 2– pętla IV, 3– pętla V, 4– pętla VII, 5– pętla VIII), a epitop numer 6 odpowiada pętli błony wewnętrznej i zastosowano jako kontrolę, B – lokalizacja epitopu nr 3 (RYDERY) na powierzchni OmpC.

Rycina 4. Widmo masowe ESI-MS potwierdzające tożsamość otrzymanego peptydu cyklicznego o sekwencji aminokwasowej [GGLNRYDERYIGK]-C.

Rycina 5. Widmo masowe ESI-MS potwierdzające tożsamość otrzymanego peptydu liniowego o sekwencji aminokwasowej GLNRYDERYIGC.

Rycina 6. Wykres pudełkowy – graficzna prezentacja statystycznego rozkładu mian przeciwciał w obrębie badanej grupy.

Rycina 7. Rozdział elektroforetyczny ekstraktów (I, II) białek błony zewnętrznej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, po dwóch etapach ekstrakcji z użyciem kwasu walerianowego.

Rycina 8. Obraz uzyskany po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący skład białkowy ekstraktu z *S. flexneri*. Frakcje 9–32 otrzymane po oczyszczaniu preparatu na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200.

Rycina 9. Obraz uzyskany po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym, przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) ilustrujący skład białkowy ekstraktu z błony komórkowej *Shigella flexneri* 3a (1) oraz preparatu białek (2) po pierwszym etapie oczyszczania metodą filtracji żelowej.

Rycina 10. Obraz elektroforetyczny przedstawiający A) ekstrakt białkowy po izolacji z błony zewnętrznej *Shigella flexnerii* 3a (15 μ g) oraz B) homogenny preparat białka OmpC otrzymany po chromatografii jonowymiennej na złożu DE-52 (5 μ g).

Rycina 11. Reaktywność preparatu białka OmpC z surowicą ludzką oznaczona metodą Western Blot.

Rycina 12. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący preparat BSA przed procesem oczyszczania.

Rycina 13. Obraz uzyskany po elektroforezie w 8% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący skład białkowy poszczególnych frakcji po oczyszczaniu BSA na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200.

Rycina 14. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący preparat BSA przed i po oczyszczeniu na kolumnie ze złożem Sephacryl S-200 w dawkach 2, 3, 4 i 5 µg.

Rycina 15. Obliczanie stopnia obsadzenia białka nośnikowego peptydami.

Rycina 16. Widma mas BSA oraz koniugatu BSA-peptyd cykliczny (A) oraz koniugatu BSA-peptyd liniowy (B) otrzymane za pomocą techniki MALDI-TOF-MS (zgodnie z metodą nr 3.15).

Rycina 17. Profil elucji przeciwciał surowicy ludzkiej krwi obwodowej z kolumny powinowactwa ze złożem Sepharose CL-4B z immobilizowanym białkiem OmpC. Linia niebieska pokazuje stężenie białka mierzone w aparacie nano-drop, kolorem czerwonym zaznaczono absorbancje roztworu do elucji przeciwciał.

Rycina 18. Elektroforeza SDS-PAGE przeciwciał anti-OmpC wyizolowanych z ludzkiej krwi za pomocą chromatografii powinowactwa ze złożem Sepharose CL-4B–OmpC. Ścieżki 1 oraz 2 zawierają te same przeciwciała w różnym stężeniu.

Rycina 19. Swoiste przeciwciała anti-OmpC (A) wyizolowane z ludzkiej surowicy za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu Sepharose CL-4B–OmpC po rozdziale elektroforetycznym poszczególnych łańcuchów przeciwciał w warunkach denaturujących SDS-PAGE i po transferze na membranę Immobilon P, wybarwione Panceau red (B) reaktywność poszczególnych łańcuchów swoistych przeciwciał anti-OmpC z drugorzędowymi przeciwciałami anti-ludzkimi klas: IgA, IgM i IgG skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną (AP).

Rycina 20. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący uzyskany w systemie ekspresyjnym *E. coli* preparat rekombinowanego białka OmpC (ścieżka 1) oraz natywnego białka OmpC pozyskanego z *S. flexneri* 3a (ścieżka 2 i 3).

Rycina 21. Rekombinowane białko OmpC po rozdziale elektroforetycznym i transferze na membranę Immobilon P (A) oraz jego reaktywność z surowicami dwóch krwiodawców (B I i B II) w rozcieńczeniu 1:100, oznaczona metodą Western Blot.

Rycina 22. Obraz uzyskany po elektroforezie w 12,5% żelu poliakrylamidowym przeprowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), ilustrujący preparat rekombinowanego białka OmpC w systemie ekspresyjnym *E.coli* (ścieżki 1–4) oraz natywnego białka OmpC pozyskanego z *S. flexneri* 3a.

Rycina 23. Obraz po rozdziale elektroforetycznym rekombinowanego białka OmpC. Ścieżki oznaczone numerami 1–5 przedstawiają kolejne etapy oczyszczania w buforze bez dodatku detergentu/mocznika, 6–9 w buforze z dodatkiem detergentu (Tween 20) oraz 10–16 w buforze z dodatkiem mocznika.

Rycina 24. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA anti-OmpC oznaczone w badanych grupach pacjentów i grupach kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Rycina 25. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA anty-koniugat cykliczny/BSA, oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Rycina 26. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgA anty-koniugat liniowy/BSA, oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Rycina 27. Analiza porównawcza miana swoistych przeciwciał klasy IgA w surowicach kobiet (♀) i mężczyzn (♂) w zależności od antygeny (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA) użytego do testu ELISA.

Rycina 28. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgA, oznaczone w teście ELISA wobec trzech antygenów (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA) obecne w surowicach badanych grup w zależności od wieku.

Rycina 29. Uśrednione miana przeciwciał anty-OmpC klasy IgG oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych, przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Rycina 30. Uśrednione miana przeciwciał klasy IgG anty-koniugat cykliczny/BSA, oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Rycina 31. Uśrednione miana swoistych przeciwciał klasy IgG anty-koniugat liniowy/BSA oznaczone w surowicach badanych grup pacjentów i grup kontrolnych przedstawione na wykresach pudełkowych box-plot oraz wykresach słupkowych z uwzględnieniem istotności statystycznej „P” ($P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$).

Rycina 32. Analiza porównawcza miana swoistych przeciwciał anty-OmpC klasy IgG w surowicach kobiet (♀) i mężczyzn (♂) w zależności od antygeny (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA) użytego do testu ELISA.

Rycina 33. Przedstawienie średniego miana swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicach badanych grup, określonego dla trzech antygenów użytych w teście ELISA (białko OmpC, koniugat liniowy/BSA, koniugat cykliczny/BSA), w zależności od wieku badanych.

Osiągnięcia i działalność naukowa

Publikacje przeglądowe

1. **P. Naporowski**, D. Witkowska, A. Lewandowicz-Uszyńska, A. Gamian: Zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze towarzyszące pierwotnym niedoborom odporności manifestacją zaburzeń procesów immunologicznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2018; 72: 557-572; IF=1,106
2. A. Lewandowicz-Uszyńska, **P. Naporowski**, G. Pasternak, D. Witkowska: Identyfikacja czynników etiologicznych zakażeń bakteryjnych i wirusowych na podstawie testów serologicznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2018; 72: 1162-1178; IF=1,106

Publikacje oryginalne

1. M. Sochocka, M. Ochnik, M. Sobczyński, I. Siemieniec, B. Orzechowska, **P. Naporowski**, J. Leszek: New therapeutic targeting of Alzheimer's disease with the potential use of proline-rich polypeptide complex to modulate an innate immune response-preliminary study. *Journal of Neuroinflammation*, 2019; 16(1): 137; IF=5,793
2. A., Katarzyna Pacyga, **P. Naporowski**, D. Martynowski, A. Szuba, A. Gamian, S. Górka: Identification of linear epitopes on the flagellar proteins of *Clostridioides difficile*. *Scientific Reports*, 2021; 11(1), 1-13; IF=4,997
3. M. Ochnik, D. Franz, M. Sobczyński, **P. Naporowski**, M. Banach, B. Orzechowska, M. Sochocka: Inhibition of Human Respiratory Influenza A Virus and Human Betacoronavirus-1 by the Blend of Double-Standardized Extracts of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot and *Sambucus nigra* L. *Pharmaceuticals*, 2022; 15(5): 619, IF=5,215
4. M. Sochocka, M. Ochnik, M. Sobczyński, K. Gębura, A. Zambrowicz, **P. Naporowski**, J. Leszek: Ginkgo Biloba Leaf Extract Improves an Innate Immune Response of Peripheral Blood Leukocytes of Alzheimer's Disease Patients. *Nutrients*, 2022; 14(10); IF=6,706
5. Kamil Litwinowicz, Ewa Waszczuk, Aleksandra Kuzan, Agnieszka Bronowicka-Szydełko, Kinga Gostomska-Pampuch, **Piotr Naporowski**, Andrzej Gamian: Alcoholic Liver Disease Is Associated with Elevated Plasma Levels of Novel Advanced Glycation End-Products: A Preliminary Study. *Nutrients*, 2022; 14(24): 5266; IF=6,706

Doniesienia zjazdowe

1. **P. Naporowski**, D. Witkowska, A. Lewandowicz-Uszyńska, A. Gamian, Studies on the reactivity of human serum IgG and IgA antibodies with the bacterial OmpC protein as a potential diagnostic marker of humoral immunodeficiency in children, 4th International Wrocław Scientific Meetings, Wrocław, Poland, prezentacja ustna (online), 09-10.10.2020 r.
2. **P. Naporowski**, A. Jarzab, D. Witkowska, A. Lewandowicz-Uszyńska, A. Gamian, Enterobacterial OmpC protein recognized by human umbilical cord antibody as a potential

diagnostic marker of humoral immunodeficiency in children, The XVI th Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Warszawa, 08-10.06.2017 r.

3. A. Gamian, **P. Naporowski**, A. Jarzab, D. Witkowska, A. Lewandowicz-Uszyńska, Enterobacterial OmpC protein recognized by protective umbilical cord antibodies as a potential antigen for conjugate vaccine, 7th International Weigl Conference, Lviv, Ukraine, 26-29.09.2017 r.

4. O. Błachowicz, K. Zwolińska, T. Tomczyk, B. Knysz, J. Gąsiorowski, B. Orzechowska, M. Sochocka, **P. Naporowski**, M. Zalewska, E. Piasecki: Wpływ interakcji między receptorami KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) i ich ligandami HLA na podatność na zakażenie HIV-1. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości” Bydgoszcz, 25-27 września 2016 r.

5. **P. Naporowski**, „Optymalizacja metod namnażania wybranych wirusów oraz testów biologicznych z ich wykorzystaniem,” konferencja IV Forum Młodych Biotechnologów w IITD PAN we Wrocławiu; 12.06.2016 r., wystąpienie ustne

Udział w realizacji projektów

1. TANGO2/340018/NCBR/2017: Innowacyjny test diagnostyczny do wykrywania zakażeń *Streptococcus agalactiae* i nosicielstwa wśród ciężarnych, Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski Collegium Medicum UJ w Krakowie, kierownik projektu: dr hab. Monika Brzywczy-Włoch, wykonawca

2. projekt „Typowanie polimorficznych genów kodujących immunoglobulinopodobne receptory komórek NK (KIR) w grupie pacjentów zakażonych HIV pochodzących z regionu Dolnego Śląska” 2014 r., wykonawca

3. projekt „Oznaczenie miana przeciwciał przeciwko wirusowi pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) w surowicach ludzkich” 2013 r., wykonawca

Popularyzacja nauki

1. prowadzenie warsztatów w ramach projektu „Mistrz i Uczeń” Fundacji Uniwersytet Dzieci

2. współorganizacja konkursu mikrobiologicznego oraz warsztatów w ramach DFN we Wrocławiu

3. warsztaty w Szkole Podstawowej nr 61 we Wrocławiu pt. „HIV – tak straszny jak go malują?”

Opieka nad studentami

1. Opieka nad studentką realizującą pracę magisterką – Karolina Łapin, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, temat pracy: „Charakterystyka poziomu przeciwciał przeciw białku OmpC z *Shigella flexneri* 3a w surowicach pacjentów z niedoborami immunologicznymi”, promotor dr hab. Danuta Witkowska

2. Opieka nad studentem – praktyka wakacyjna – Dominik Stefan, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, temat praktyk: Ekstrakcje i oczyszczanie białka OmpC z *Shigella flexneri*

3. Opieka nad studentką – praktyka wakacyjna – Joanna Irek, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, temat praktyk: Izolacja i oczyszczanie przeciwciał anti-OmpC z surowicy krwi ludzkiej

Szkolenia

Szkolenie dla osób uczestniczących w wykonywaniu procedur na zwierzętach, IITD PAN Wrocław, 23.11.2016-11.01.2017 r.

Udział w konferencjach

I Konferencja Doktorantów PAN, Falenty, 23-25 czerwca 2017

II Konferencja Doktorantów PAN, Falenty, 05-07 października 2018

III Konferencja Doktorantów PAN, Jabłonna, 11-13 października 2019

Działalność na rzecz IITD PAN

1. Sekretarz Studium Doktoranckiego 2016-2017
2. Z-ca Prezesa Studium Doktoranckiego 2017-2018
3. Prezes Studium Doktoranckiego 2018-2019 i 2019-2020
4. Przedstawiciel doktorantów w Radzie Naukowej IITD PAN w kadencji 2019-2022

Staż

Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, czerwiec-lipiec 2020 r.

Technik Laboratoryjny w Laboratorium Diagnostycznym Zakażeń SARS-CoV-2 IITD PAN

Koło Naukowe

Od 2016 Członkostwo w Kole Naukowym Młodych Biotechnologów w IITD PAN

Nagrody

1. Indywidualna Nagrody Dyrektora za wkład w działalność diagnostyczną Laboratorium Diagnostyki Zakażeń SARS-CoV-2 Centrum Medycznego Instytutu Hirszfelda
2. Zespołowa Nagroda Dyrektora za opublikowanie pracy oryginalnej o najwyższym współczynniku wpływu (IF) w kategorii „wiodąca rola IITD PAN”:
publikacja : M. Sochocka, M. Ochnik, M. Sobczyński, I. Siemieniec, B. Orzechowska, **P. Naporowski**, J. Leszek: New therapeutic targeting of Alzheimer’s disease with the potential use of proline-rich polypeptide complex to modulate an innate immune response-preliminary study. Journal of Neuroinflammation, 2019; 16(1): 137; IF=5,793