

## 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.