

Małgorzata Stasiójć

Szczepionka przeciwko *Helicobacter pylori* oparta o przetrwalniki bakterii *Bacillus subtilis*

Promotor: prof. Michał Obuchowski

Streszczenie

Zakażenie *Helicobacter pylori* uważane jest za najczęściej występującą infekcję bakteryjną na świecie. Choć w większości przypadków nie powoduje ono dolegliwości, u około 10 % nosicieli prowadzi do rozwinięcia wrzodów żołądka i dwunastnicy, a w 1-2% - do raka żołądka. Leczenie, obejmujące zastosowanie kombinacji dwóch antybiotyków i inhibitora pompy protonowej, zazwyczaj jest skuteczne, choć stosunkowo kosztowne, długotrwałe oraz powoduje wiele efektów ubocznych. Coraz częściej jednak notuje się występowanie szczepów antybiotykoopornych. Ponadto przebycie infekcji nie pozostawia po sobie odporności na ponowne zakażenie, w związku z czym bardzo często infekcje nawracają. Z tego powodu konieczne jest opracowanie nowych form terapii, w szczególności takich, które zapewnią długotrwałą odporność. W dalszym ciągu jednak odpowiedź immunologiczna na zakażenie *H. pylori* nie została do końca poznana, a jeszcze mniej wiadomo na temat mechanizmów zapewniających odpowiedź ochronną.

Nowoczesne szczepionki podjednostkowe wykorzystują oczyszczone, rekombinowane antygeny w miejsce całych, zabitych lub atenuowanych, komórek bakteryjnych. Dzięki temu ich stosowanie nie niesie ze sobą ryzyka skutków ubocznych. Oczyszczone białka są jednak nietrwałe, tak w przechowywaniu, jak i po podaniu pacjentowi, a także często nie są zdolne do wywołania wystarczająco silnej odpowiedzi immunologicznej. Konieczne jest więc zastosowanie odpowiedniego nośnika antygenów, a także adjuwantów wzmacniających odpowiedź immunologiczną.

Opracowanie metod doustnej immunizacji stanowi interesującą alternatywę dla obecnie stosowanych szczepionek, wymagających podskórnego podania. Nowa droga podania szczepionki może nie tylko ułatwić jej wykorzystanie w krajach trzeciego świata czy ograniczyć barierę psychologiczną (strach przed igłą), ale także daje szansę na wzbudzenie lokalnej odpowiedzi immunologicznej w miejscu podania (układ trawienny), w przypadku gdy celem jest ochrona przed patogenami atakującymi drogi pokarmowe.

Przetrwalniki niepatogennej, probiotycznej bakterii *Bacillus subtilis* mogą zostać wykorzystane jako trwałe i wygodny w użyciu nośnik białek heterologicznych takich jak enzymy stosowane w przemyśle, białka o znaczeniu terapeutycznym czy antygeny zdolne do pobudzenia specyficznej odpowiedzi immunologicznej. W niniejszej pracy przedstawiono konstrukcję czterech wektorów umożliwiających prezentację białek heterologicznych w formie fuzji z białkami płaszcza przetrwalnika. Pozwalają one na tworzenie fuzji N- lub C-końcowych, jak również rozdzielenie partnerów fuzji krótkim peptydowym łącznikiem.

W dalszej części pracy badano odpowiedź immunologiczną myszy na rekombinowane przetrwalniki prezentujące dwa modelowe antygeny *H. pylori*: UreA oraz UreB. Przetrwalniki te podawano drogą dożołądkową lub donosową. Dodatkowo badano wpływ adjuwantów, takich jak chitosan, saponiny,

wodorotlenek glinu oraz interleukina 2 zaprezentowana na powierzchni przetrwalników, na modulację odpowiedzi immunologicznej. Oznaczano poziom przeciwciał IgG w surowicy immunizowanych myszy, jak również obecność przeciwciał sIgA w układach pokarmowych i odchodach zwierząt. Określono również profil cytokin wydzielanych przez stymulowane antygenem splenocyty pozyskane z immunizowanych zwierząt.

Wyniki pokazały, że rekombinowane przetrwalniki prezentujące antygeny *H. pylori* podawane dożołądkowo wraz z adjuwantami (wodorotlenek glinu oraz przetrwalniki prezentujące IL-2) wzbudzają odpowiedź immunologiczną spolaryzowaną w kierunku odpowiedzi Th1/Th17. Podanie przetrwalników drogą donosową wzbudza zbalansowaną odpowiedź Th1/Th2/Th17, a także prowadzi do podwyższenia poziomu antygenowo-specyficznych przeciwciał IgG w surowicy. Ponadto badania *in vitro* z zastosowaniem linii komórkowej wykazały, że cytokiny wydzielane przez splenocyty pozyskane z immunizowanych myszy silnie aktywują mysie makrofagi.

Przedstawione wyniki sugerują, że przetrwalniki *B. subtilis* są obiecującym nośnikiem antygenów w szczepionkach przeciwko *H. pylori* podawanych drogą przezśluzówkową. Konieczne jest jednak przeprowadzenie dalszych badań w celu doboru odpowiednich antygenów i adjuwantów, jak również ocena skuteczności potencjalnej szczepionki w doświadczeniach typu *challenge*.