

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Kwartalnik

Tom 52

Zeszyt 3•2013

LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:

PMKMAV 52 (3)

2013

Index Copernicus ICV = 9,52 (2012)

Impact Factor ISI = 0,151 (2012)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2012)

<http://www.pm.microbiology.pl>

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka),
EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski),
WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków), MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), JERZY HREBENDA (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

ADRESY REDAKCJI

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 04, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl; j.hrebenda@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
tel./fax: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

Stali recenzenci:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
JÓZEF KUR (Politechnika Gdańska), EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Fonsecaea monophora – szczegóły morfologii (widoczny konidiofor i układ konidiów). SEM, pow. 4 000 x.
Autor zdjęcia: dr n. med. Tomasz Jagielski; Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl.

Szanowni Państwo! Autorzy i Czytelnicy *Postępów Mikrobiologii*: Informujemy Państwa, że uległ zmianie numer konta bankowego Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Aktualny numer konta: BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 1150, Objętość 15 arkuszy wyd., Papier offset 80 g

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

Katarzyna Szczypa¹, Joanna Wilemska², Waleria Hryniewicz³, Izabela Sitkiewicz^{3*}

¹ALAB Laboratoria, ul Stępińska 22/30, 00-739 Warszawa

²Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa

³Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2013 r.

Spis treści: 1. Wstęp. 2. Zakażenia wywołane przez *S. pyogenes*. 3. Nosicielstwo i drogi szerzenia się zakażeń *S. pyogenes*. 4. Ustalanie pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami *S. pyogenes*. 5. Oporność *S. pyogenes* na antybiotyki. 6. Profilaktyka zakażeń *S. pyogenes*. 7. Podsumowanie

Epidemiology of *Streptococcus pyogenes* infections, clonal structure population and antibiotic resistance

Abstract: *Streptococcus pyogenes* (GAS) is one of the major human pathogens responsible for infections worldwide. It may cause mild infections of the skin and mucosal surfaces, as well as severe invasive infections. It has been estimated that *S. pyogenes* is responsible for half a million deaths a year, and is considered as one of the most important pathogens.

Many clinical investigations on *S. pyogenes* focus on characterization of pathogenic strains, heterogeneity/homogeneity of the population clonal spread, transfer between patients and tracing sources of antibiotic resistance. Advanced studies on vaccines that prevent GAS infections are in progress.

Contents: 1. Introduction. 2. *S. pyogenes* infections. 3. Carrier state and epidemiology of infections. 4. *S. pyogenes* strains genetic affinity. 5. *S. pyogenes* resistance to antibiotics. 6. The prophylactics of *S. pyogenes* infections. 7. Summary

Słowa kluczowe: *Streptococcus pyogenes*, GAS, oporność na antybiotyki, *erm*, struktura klonalna

Key words: *Streptococcus pyogenes*, GAS, antibiotic resistance, *erm*, clonal structure

1. Wstęp

Streptococcus pyogenes (paciorkowiec β -hemolizujący grupy A, ang. group A *Streptococcus*, GAS) jest Gram-dodatnim, katalazo-ujemnym ziarniakiem, należącym do liczącego ponad 50 gatunków rodzaju *Streptococcus*. Rodzaj ten skupia bakterie, które powodują infekcje szerokiej grupy gospodarzy, począwszy od człowieka po wiele gatunków zwierząt domowych i dzikich. Paciorkowce kolonizują różne tkanki gospodarza stanowiąc tzw. „normalną florę bakteryjną”, są też przyczyną wielu infekcji [30]. *S. pyogenes* jest ścisłym patogenem człowieka, charakteryzuje się zdolnością do całkowitej hemolizy typu β krwinek czerwonych na podłożu stałym i występowaniem na powierzchni komórki grupowego wielocukru A (grupowanie wg Lancefield) [23].

GAS jest odpowiedzialny za szeroki wachlarz zakażeń o różnym stopniu ciężkości. Niektóre z nich, choć występują stosunkowo rzadko mają charakter inwazyjny tzn. rozwijają się w fizjologicznie jałowych miejscach organizmu i, pomimo leczenia, obarczone są wysoką śmiertelnością. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) szacunkowa liczba zgonów w wyniku inwazyjnych infekcji GAS i powikłań po zakażeniach wynosi ponad 500 000 przypadków rocznie, co umiejscawia

S. pyogenes pośród dziesięciu najważniejszych patogenów człowieka [15]. Globalny charakter zakażeń, oporność na niektóre klasy antybiotyków czy obecność wysoce zjadliwych klonów wśród szczepów inwazyjnych powoduje, że *S. pyogenes* jest przedmiotem ciągłego zainteresowania lekarzy, mikrobiologów i epidemiologów.

Jednym z głównych celów prowadzonych nad tym drobnoustrojem badań jest śledzenie zmian w patogenności i we wrażliwości na stosowane w terapii zakażeń leki. Podejmowane są również próby badań epidemiologicznych wyjaśniających podłoże genetyczno-populacyjne obserwowanej różnorodności lub klonalności pomiędzy szczepami GAS i związek pomiędzy grupami szczepów o określonych cechach a typami wywołujących zakażeń i ich ciężkością [11].

2. Zakażenia wywołane przez *S. pyogenes*

Pomimo ogromnego postępu medycyny i możliwości stosowania ciągle skutecznego wobec *S. pyogenes* antybiotyku – penicyliny (patrz rozdział 5), nadal notuje się na całym świecie wysoką zapadalność na infekcje *S. pyogenes*. Są to przede wszystkim zakażenia pozaszpitalne w większości o charakterze sporadycznym.

* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; e-mail: isitkiewicz@cls.edu.pl

Ich przeważająca liczba to zapalenie gardła i migdałków podniebiennych (angina paciorkowcowa) pojawiające się szczególnie w krajach o klimacie umiarkowanym oraz powierzchowne zapalenia skóry (liszajec) występujące częściej w klimacie ciepłym i wilgotnym. Szacuje się, że globalnie w skali roku GAS jest przyczyną 616 milionów przypadków infekcji gardła a także 111 milionów przypadków infekcji skórnych (głównie liszajca) [15]. Obie postacie zakażeń mają stosunkowo łagodny charakter, ale nieleczone lub leczone nieprawidłowo, mogą prowadzić do wystąpienia powikłań zarówno o charakterze ropnym, jak i nieropnym. W przypadku anginy paciorkowcowej bezpośrednio ropne powikłania po zakażeniu mogą przyjmować postać ropnia około-migdałkowego, zapalenia tkanek około migdałkowych (cellulitis), ropnego zapalenie wyrostka sutkowatego, zapalenia węzłów chłonnych, ucha środkowego, zatok i znacznie rzadziej bakteriemii, zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i ropni mózgu [46]. Może także dojść do rozwoju martwiczego zapalenia powięzi (patrz niżej). W przypadku zakażeń skóry najczęstszą, ale łagodną postacią jest liszajec. Natomiast znacznie cięższymi formami infekcji obejmującymi tkankę podskórną i powierzchowne naczynia limfatyczne jest róża (łac. *erysipelas*) a także tzw. cellulitis dotyczący głębszej warstwy podskórnej i tkanki tłuszczowej; nieleczone mogą bezpośrednio prowadzić do ciężkich postaci zakażenia (patrz niżej) prowadzących do zgonu.

W 2–3 tygodniu po przebyciu paciorkowcowym zapaleniu gardła, najczęściej u młodych nieleczonych osób, może rozwinąć się ciężkie nieropne powikłanie pod postacią gorączki reumatycznej. Choroba ta charakteryzuje się wielonarządowym procesem zapalnym o podłożu autoimmunologicznym i ujawnia się głównie jako zapalenie mięśnia sercowego oraz zapalenie stawów, które szybko mija; rzadziej jako płasawica, rumień brzeżny. Gorączka reumatyczna jest najczęstszą przyczyną nabytych wad serca. Kolejnym nieropnym powikłaniem może być ostre kłębuszkowe zapalenie nerek, które może poprzedzać nie tylko angina paciorkowcowa, ale również wywoływane przez GAS zakażenia skóry. Jest to choroba również o podłożu immunologicznym, w przebiegu której obserwuje się uszkodzenia kłębuszków nerkowych na skutek odkładania się w nich kompleksów immunologicznych. Obecnie liczba zachorowań na gorączkę reumatyczną i kłębuszkowe zapalenie nerek jest niska w krajach o wysokim statusie ekonomicznym, jednak w krajach rozwijających się stanowi nadal poważny problem [15]. W krajach takich jak Boliwia, Indie, Sudan czy Zambia aż 10% dzieci w wieku szkolnym może cierpieć z powodu popaciorkowcowego zapalenia serca i wynikających z niego wad serca. W Indiach choroba ta odpowiada za połowę schorzeń serowo-naczyniowych będących przyczyną śmierci wielu młodych osób do 40 roku życia [15].

Niektórzy badacze również sugerują związek pomiędzy zaburzeniami autoimmunologicznymi i neuropsychiatrycznymi u dzieci powiązane z zakażeniem GAS i polegające na zaostrzeniu przez zakażenie GAS zaburzeń obsesyjno-kompulsywnych lub tików, tzw. zespół PANDAS [42, 51].

Zakażenia GAS nie ograniczają się jednak tylko do zapalenia gardła i powierzchownych infekcji skóry. Drobnoustroj ten odpowiedzialny jest również za głębokie infekcje zagrażające życiu wymagające natychmiastowej interwencji lekarza. Należą do nich poważne choroby układowe (inwazyjne) takie jak posocznica i paciorkowcowa zespół wstrząsu toksycznego (*streptococcal toxic shock syndrome*, STSS), często jako następstwo martwiczego zapalenia powięzi (*necrotizing fasciitis*, NF) [23, 74, 75].

Częstość zachorowań na ciężkie zakażenia GAS zaczęła wzrastać w drugiej połowie lat 80. XX wieku. W wielu krajach, między innymi w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Wielkiej Brytanii od wczesnych lat 90-tych gromadzone są dane na temat epidemiologii inwazyjnej choroby paciorkowcowej. Według danych przedstawionych przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta), co roku w Stanach Zjednoczonych występuje od 10 do 15 tysięcy zakażeń inwazyjnych GAS, które są przyczyną około 2000 zgonów [65].

W Polsce prowadzony jest rejestr zachorowań wywołanych przez *S. pyogenes* na podstawie zgłoszeń nadsyłanych do Wojewódzkich Stacji Sanitarно-Epidemiologicznych a następnie do Zakładu Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (NIZP-PZH) (http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2011/index_mp.html). Według rejestru, w Polsce w 2011 r., wystąpiły zaledwie cztery przypadki STSS. Wszystkie pozostałe zakażenia zakwalifikowane jako inwazyjne (3 399 przypadków) to przypadki wystąpienia róży. Raporty dotyczące zakażeń inwazyjnych w Polsce nie świadczą niestety o braku występowania inwazyjnych zakażeń w naszym kraju, a jedynie o braku ich rozpoznawalności przez lekarzy i precyzyjnego systemu raportowania. W ramach działania krajowych ośrodków referencyjnych ds. Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN, www.koroun.edu.pl) i ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD, www.korld.edu.pl), oraz programów monitorowania inwazyjnych zakażeń (sieć BiNET, http://www.koroun.edu.pl/binet_info01.php) corocznie gromadzonych jest kilkadziesiąt izolatów z inwazyjnych zakażeń GAS nadesłanych z terenu całego kraju. Pierwsze dane o molekularnych cechach szczepów wywołujących inwazyjne zakażenia GAS w Polsce są wynikiem pracy tych ośrodków [74].

Uważa się powszechnie, że GAS jest patogenem odpowiedzialnym przede wszystkim za zakażenia pozaszpitalne. Jednak ta bakteria, wprawdzie znacznie rzadziej, jest również odpowiedzialna za zakażenia związane z opieką zdrowotną, w tym szpitalne. Prezentowane

w latach 1965–2004 doniesienia opisują 61 epidemicznych ognisk szpitalnych zakażeń GAS, obejmujących liczbę od 2 do 56 przypadków. Były to głównie zakażenia miejsca operowanego oraz zakażenia okołoporodowe. Szacuje się, że odsetek szpitalnych zakażenia GAS może sięgać nawet 14% [25, 26]. Również w Polsce obserwuje się pojedyncze szpitalne ogniska epidemiczne wywołane przez GAS [70] (Sitkiewicz i Hryniewicz, KORLD, dane niepublikowane).

3. Nosicielstwo i drogi szerzenia się zakażeń *S. pyogenes*

GAS jest drobnoustrojem, dla którego człowiek jest jedynym gospodarzem. Pomimo, że nosicielstwo *S. pyogenes* występuje głównie w górnych drogach oddechowych (błona śluzowa gardła) i na skórze człowieka to bakterie te mogą również kolonizować narządy moczopłciowe (pochwę) i okolice odbytu. Stopień nosicielstwa jest zależny od wieku człowieka. Najczęściej nosicielami są dzieci w wieku szkolnym, których odsetek waha się w zakresie od 12 do 23%. Odsetek nosicieli pośród osób dorosłych jest niższy i wynosi około 5% [47]. Zakażenie GAS szerzy się drogą kropelkową lub poprzez bezpośredni kontakt z wydzieliną z błon śluzowych nosogardła osoby chorej lub nosiciela. Przenoszenie drobnoustroju może też odbywać się na drodze kontaktu z zakażoną raną lub zmienioną chorobowo skórą. Okres wylegania choroby jest różny, dla zapalenia gardła i migdałków wynosi 2 do 5 dni, dla zakażeń skóry czas ten jest nieco dłuższy i obejmuje 5–7 dni. W przypadku inwazyjnej postaci zakażenia jest on zróżnicowany, i wynosi średnio 1–3 dni. Występowanie zakażeń GAS ma w większości charakter sporadyczny, aczkolwiek może przyjmować również postać ognisk epidemicznych, gdyż zapalenie gardła i liszajec potrafią rozprzestrzeniać się w dużych skupiskach ludzkich. Szacuje się, że ryzyko przeniesienia zakażenia w kontakcie domowym wynosi ok. 25%. Badania sugerują, że źródłem zakażenia i rozprzestrzeniania się GAS w środowisku domowym mogą być dzieci w wieku szkolnym ze względu na wysoką zachorowalność i nosicielstwo. Ta grupa dzieci często choruje na wirusowe zakażenia górnych dróg oddechowych, a to zwiększa rozsiew *S. pyogenes* i innych gatunków bytujących w nosogardle. Wykazano również, że więcej niż troje dzieci mieszkających w jednym gospodarstwie domowym ułatwia międzyosobnicze rozprzestrzenianie się GAS [23, 28]. W środowisku szpitalnym źródła szerzenia się zakażeń GAS są różne. Mogą to być endogenne szczepy własne skolonizowanego pacjenta oraz szczepy egzogenne pochodzące od nosicieli, którymi mogą być inni pacjenci w szpitalu lub pracownicy opieki medycznej. Bardzo rzadko źródłem GAS w szpitalu są przedmioty z otoczenia pacjenta lub sprzęt medyczny [72].

4. Ustalanie pokrewieństwa pomiędzy szczepami GAS

Ze względu na poważne konsekwencje zdrowotne i społeczne, jakie niosą za sobą opisywane zakażenia *S. pyogenes*, oprócz rozpoznania czynnika etiologicznego w konkretnym przypadku zachorowania, niezwykle ważne jest prowadzenie ciągłego monitorowania tych infekcji dla celów terapeutycznych i epidemiologicznych.

W dochodzeniu epidemiologicznym do ustalenia pokrewieństwa pomiędzy izolatami należącymi do tego samego gatunku, lub udowodnienia jego braku, wykorzystuje się klasyczne metody mikrobiologiczne oparte na ocenie cech fenotypowych mikroorganizmu oraz nowoczesne metody biologii molekularnej analizujące materiał genetyczny mikroorganizmu. Opis cech danego izolatu powstaje w tzw. procesie typowania. Przydatność systemu typowania oceniana jest na podstawie jego rozdzielczości, łatwości interpretacji wyników, ich powtarzalności, wiarygodności, szybkiego wykonania i kosztów.

W powiązaniu z danymi demograficznymi, klinicznymi i klasyczną analizą epidemiologiczną, typowanie drobnoustrojów umożliwia ustalanie potencjalnych rezerwuarów drobnoustrojów patogennych i możliwości ich rozprzestrzeniania, a w efekcie weryfikację odpowiednich schematów postępowania w przypadku wystąpienia infekcji. Oprócz znaczenia w dochodzeniu epidemiologicznym, typowanie szczepów jest niezwykle istotne w immuno- i chemioprophylaktyce, ma ważny aspekt poznawczy oraz przyczynia się do badania ewolucji bakterii [16].

Określanie cech fenotypowych (np. biochemicznych, antybiotykowrażliwości) nie jest wystarczające a jedynie przydatne na wstępnym etapie typowania drobnoustrojów i musi być wzbogacone molekularnymi technikami typowania.

W typowaniu epidemiologicznym *S. pyogenes* najważniejszą metodą jest określenie typu (dawniej serotypu) białka M. Białko M jest głównym powierzchniowym, zmiennym antygenem *S. pyogenes*, jego warianty odpowiedzialne są za powstawanie różnych serotypów GAS [75]. Wprowadzona w latach 60. XX wieku fenotypowa metoda identyfikacji typów serologicznych białka M oparta jest na reakcji pomiędzy specyficznym, N-końcowym fragmentem białka M a swoistymi przeciwciałami w teście precipitacji [40]. Pomimo długoletniego używania metoda serologiczna ma szereg ograniczeń i była stosowana przez nieliczną grupę laboratoriów referencyjnych. Ograniczenia wynikały głównie z dużej pracochłonności metody i kosztów oznaczenia, np. uzyskanie szerokiego wachlarza wzorcowych surowic odpornościowych, czy związane z tym utrzymywanie zwierząt laboratoryjnych okazało się bardzo drogie.

Aby uniknąć niedoskonałości metody serologicznej, około roku 1995 wprowadzona została metoda molekularna typowania białka M, tzw. typowanie *emm* (*emm typing*). Typowanie *emm* uważane jest dzisiaj za „złoty standard”, gdyż opierając się na sekwencjonowaniu fragmentu DNA wykazuje nawet najmniejsze różnice w budowie białka M. Metoda polega na amplifikacji fragmentu genu *emm* kodującego N-koniec białka M przy użyciu reakcji PCR, a następnie ustaleniu sekwencji 180 nukleotydów kodujących pierwsze 50 aminokwasów dojrzałego białka wraz z 10 aminokwasami sekwencji sygnałowej. Uzyskane sekwencje porównuje się z dostępną na stronie internetowej CDC bazą danych, w której znajduje się ponad 200 typów *emm*. Porównanie z sekwencją referencyjną pozwala na określenie nie tylko typu, ale i allelicznych wariantów określonego typu białka M. Jeśli sekwencja nukleotydowa 5' genu *emm* jednego szczepu jest identyczna w > 95% z sekwencją innego szczepu, to określa się, że szczepy te prezentują te same typy *emm*. Tylko w nielicznych przypadkach typy *emm* określone metodami genetycznymi nie odpowiadają typom serologicznym białka M [6, 31, 32]. Metoda molekularnego typowania *emm* jest zgodna z konwencjonalnym typowaniem serologicznym wg Lancefield, eliminuje jednak ograniczenia związane z ciągłym pojawianiem się nowych wariantów białka M, ograniczoną dostępnością surowicy a także trudnościami w interpretacji wyniku. Jej zaletą jest czułość, prostota wykonania oraz oszczędność czasowa, jedynym zaś ograniczeniem może być dostępność specjalistycznego sprzętu. Dodatkowo, nie wykrywalna na drodze serologicznej zmienność sekwencji *emm* w obrębie typu, może być przesłanką w śledzeniu ognisk epidemii oraz transmisji specyficznych klonów w populacji *S. pyogenes*. W większości przypadków w genomie występuje tylko jeden gen *emm*, choć możliwe jest występowanie do trzech odrębnych genów *emm* i *emm-like*, których aranżacja warunkuje wystąpienie tzw. wzorów *emm* (od A do E) [48].

W związku z rozwojem technik molekularnych, coraz rzadziej używa się również innych, stosowanych przez lata, metod serologicznych takich jak typowanie oparte na różnicach antygenowych białka T lub wykrywanie enzymu OF (*opacity factor*) [42, 54].

Standardową metodą używaną przez wiele laboratoriów referencyjnych do porównywania izolatów bakteryjnych, nie tylko GAS, jest analiza makrorestrykcyjna wraz z rozdziałem fragmentów w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Analizy PFGE są jednak trudne w wykonaniu i niełatwe do porównania pomiędzy różnymi ośrodkami. Metoda ta daje znakomite rezultaty w przypadku analizy niezbyt dużej liczby szczepów pochodzących z lokalnych epidemii. Ze względu na ograniczenia PFGE, od dłuższego czasu poszukiwano metod, które dałyby bardziej jednoznaczne i łatwiejsze w interpretacji wyniki.

Wraz z coraz powszechniejszym wykorzystaniem sekwencjonowania w typowaniu bakterii, coraz częściej stosowaną metodą ustalania pokrewieństwa pomiędzy szczepami GAS jest tzw. Multi Locus SequencTyping (MLST) [29]. Metoda polega na ustaleniu sekwencji nukleotydowej siedmiu (u innych gatunków ta liczba może być zmienna) alleli konserwowanych genów metabolizmu podstawowego. Każdy znany do tej pory allel ma swój unikatowy numer w bazie danych, na podstawie kodu składającego się z siedmiu liczb odpowiadających numerom alleli ustalany jest tzw. typ sekwencyjny izolatu (*sequence type*, ST). ST izolatów z całego świata mogą być ze sobą porównywane i łączone w grupy podobnych klonów, czyli tzw. kompleksy klonalne (*clonal complex*, CC). Informacja na temat znalezionych do tej pory wariantów genów ST oraz szczepów, u których zostały opisane, zdeponowana jest w internetowej bazie danych pod adresem <http://www.spyogenes.mlst.net>. Obecnie baza danych MLST dla *S. pyogenes* zawiera około 500 typów ST, które zostały wyodrębnione spośród przesłanych kilku tysięcy szczepów [33, 48]. Pomimo wielu zalet metody MLST, jakimi są wysoka czułość i powtarzalność, stosowanie jej jest ograniczone, głównie ze względu na koszt sekwencjonowania.

Aby usprawnić typowanie GAS, zmniejszyć nakłady finansowe i ułatwić analizę ciągle wprowadzane są nowe metody, które powstają dzięki rozwojowi technologii sekwencjonowania i metod PCR. Przykładem takiej nowej metody może być wersja MLST niewymagająca sekwencjonowania, zwana MeltTs. Metoda, podobnie jak sekwencjonowanie DNA wykrywa polimorfizmy w sekwencji DNA, oparta jest jednak na porównaniu krzywych topnienia (*high resolution melting curves*, HRM) dziesięciu krótkich fragmentów o długości od 59 do 119 par zasad powielonych w reakcji PCR. Każdy fragment zawiera polimorficzne miejsca (SNPs), a fragmenty w zależności od liczby par G+C różnią się od siebie temperaturą topnienia DNA. Porównanie liczby par G+C określonych na podstawie temperatury topnienia cząsteczki w 10 fragmentach DNA daje unikalny profil MeltTs. Wadą tej metody może być konieczność posiadania urządzenia zdolnego przeprowadzić analizę krzywych topnienia. Metoda ta jest w ponad 99% zgodna z analizą MLST, a wykryte różnice pomiędzy badanymi szczepami odzwierciedlają strukturę populacji [59].

Oprócz metod bazujących na ustalaniu sekwencji konserwowanych (MLST) lub zmiennych (*emm typing*) genów, do typowania można zastosować metody wykrywające określone konfiguracje genów lub mobilnych elementów genetycznych w badanych szczepach. GAS wytwarza szereg charakterystycznych czynników wirulencji, głównie tzw. superantygenów, których występowanie lub współwystępowanie może świadczyć o pokrewieństwie izolatów [13, 14]. Również obecność zintegrowanych z genomem mobilnych elementów

genetycznych jest cechą diagnostyczną i dwa szczepy o takim samym położeniu elementów w genomie są ze sobą blisko spokrewnione. Na podstawie sekwencji genomowych GAS ustalono 21 stałych miejsc integracji mobilnych czynników genetycznych takich jak fagi lub elementy ICE (*integrative conjugative elements*) w określonych miejscach genomu, których położenie może zostać użyte do projektowania systemów typowania [9]. Przykładem metod typowania opartych o wykrywanie określonych genów lub elementów genetycznych mogą być metody oparte o szereg reakcji multiplex PCR opracowane ostatnio w naszym laboratorium [13, 14].

Na podstawie analizy sekwencji genomowych, nasz zespół opracował również metodę MLVA/MLVF (**M**ulti **L**ocus **V**NTR **A**nalysis/**M**ulti **L**ocus **V**NTR **F**ingerprinting) opartą na analizie sekwencji tandemowo powtórzonych w genomie *S. pyogenes* tzw. VNTR (**V**ariable **N**umber **T**andem **R**epeats) [54, 55]. W szeregu genów GAS występują powtórzenia nukleotydowe o długości od kilkunastu do kilkuset par zasad. W reakcji multiplex PCR namnażane są fragmenty DNA o zróżnicowanej wielkości, która zależy od liczby powtórzeń występujących w danym fragmencie DNA. Im mniej różnic w wielkości produktów PCR zostanie wykrytych, tym bliżej badane szczepy są ze sobą spokrewnione.

Przyszłość metod ustalania pokrewieństwa między izolatami bakteryjnymi i badań nad ewolucją bakterii, na razie niestety ograniczona przez zbyt wysokie koszty, leży w całościowych analizach genomów bakteryjnych. Przykładem wykorzystania do analizy epidemii wywołanych przez *S. pyogenes* technik sekwencjonowania nowej generacji jest analiza kilkuset szczepów serotypu M3 izolowanych z inwazyjnych zakażeń wywołanych GAS [8]. Analiza porównawcza całych genomów pozwoliła nie tylko prześledzić dynamikę rozwoju epidemii w następujących po sobie falach zachorowań, ale również przyczyniła się do wykazania wpływu pojedynczych mutacji w genomie na wirulencję GAS. Przykładem może być pojedyncza mutacja w genie *mtsR* odpowiedzialnym za regulację transportu jonów metali na aktywację głównej proteazy GAS-SpeB [56].

5. Oporność *S. pyogenes* na antybiotyki

Podstawowym antybiotykiem stosowanym w leczeniu zakażeń *S. pyogenes* jest penicylina. Jak dotąd wszystkie szczepy GAS są w pełni wrażliwe na ten antybiotyk, a wrażliwość na penicylinę oznacza również wrażliwość na inne antybiotyki beta-laktamowe [45]. Od ponad 70 lat nie uległo zmianie minimalne stężenie penicyliny hamujące wzrost *S. pyogenes* (MIC). Fenomen ciągłej wrażliwości GAS na beta-laktamy tłumaczy się z jednej strony brakiem odpowiednich mechanizmów umożliwiających wniknięcie do komórki bakterii plazmidu niosącego gen beta-laktamazy, jak również słabej zdolności GAS do transformacji [35, 45]. Dodatkowo istnieje hipoteza mówiąca o tym, że koszt energetyczny ponoszony przez komórkę bakteryjną GAS w zmniejszeniu powinowactwa PBP do molekuł antybiotyku jest zbyt wysoki, aby mógł ulec utrwaleniu. Wyhodowane bowiem w laboratorium niewrażliwe na penicylinę mutanty *S. pyogenes* produkujące zmienione białka PBP charakteryzowały się obniżoną żywotnością i szybko ginęły [37]. Mimo to istnieje obawa, że wśród paciorkowców grupy A, podobnie jak u wielu ziarenkowców Gram-dodatnich dzielących z nimi tę samą niszę ekologiczną, może pojawić się niewrażliwość na ten antybiotyk [3, 15].

Wydaje się więc niezwykle istotnym, aby stale monitorować wrażliwość *S. pyogenes* zarówno na penicylinę, jak i na antybiotyki innych grup stosowane w leczeniu zakażeń tym drobnoustrojem (www.antybiotyki.edu.pl).

Należy również podkreślić fakt, że sama penicylina nie jest w pełni skuteczna w przypadku rozwijających się głęboko w tkankach inwazyjnych zakażeń. W takich przypadkach konieczne jest zastosowanie innych terapii antybiotykowych. Od wielu lat antybiotyki makrolidowe stanowią ważną alternatywę dla penicyliny, zwłaszcza w leczeniu zakażeń u osób z nadwrażliwością na penicylinę. Wzrost ich znaczenia wiąże się ze zwiększającym się udziałem w zakażeniach człowieka bakterii atypowych i z wykrytą stosunkowo niedawno unikatową cechą preparatów makrolidowych, tzn. ich działaniem przeciwzapalnym [57].

Antybiotyki makrolidowe nie mogą jednak zastąpić w terapii antybiotyków beta-laktamowych ze względu na coraz częściej pojawiającą się oporność na tę grupę leków. Wśród szczepów opornych na makrolidy często występuje krzyżowa oporność na linkozamidy, mające to samo miejsce i często wspólny mechanizm oporności. Bakterie wykazujące taką krzyżową oporność są izolowane w wielu krajach na świecie, a problem został dostrzeżony w latach 90. XX wieku [21]. W Europie pierwsze paciorkowce grupy A odporne na erytromycynę zanotowano już w roku 1959 w Wielkiej Brytanii [44]. Wzmożone zużycie antybiotyków tej klasy, obserwowane w przeciągu ostatnich dwudziestu lat, spowodowało niekorzystny z perspektywy terapii, drastyczny wzrost oporności wśród GAS. Dane pochodzące z różnych regionów świata, jednogłośnie podnoszą ten problem, szacując odsetek opornych szczepów na poziomie od 2,7% aż do 40% [2, 10, 39, 43, 50, 53, 58, 60, 67, 73, 78]. W Polsce poziom oporności GAS na erytromycynę szacuje się w granicach 12%, z tendencją do systematycznego wzrostu [73]. W badaniach populacyjnych obserwuje się klonalne rozprzestrzenianie określonych serotypów GAS takich jak M4, M28, M75 i M77 wykazujących oporność na antybiotyki makrolidowe [34, 64], (B o r e k, O b s z a ń s k a i S i t k i e w i c z, dane niepublikowane).

Oporność bakterii na makrolidy jest związana trzema podstawowymi mechanizmami: (i) modyfikacją celu działania antybiotyku, (ii) aktywnym jego wypompowywaniem z komórki bakteryjnej oraz (iii) modyfikacją

enzymatyczną antybiotyku. Wśród paciorkowców grupy A powszechnym mechanizmem oporności na makrolidy jest modyfikacja celu działania leku, czyli potranskrypcyjna modyfikacja podjednostki 23S rybosomowego RNA. Enzymy modyfikujące RNA są kodowane przez geny *erm* (*erythromycin resistance methylase*) należące do dużej grupy *ermAM* z dwoma występującymi u *S. pyogenes* genami *ermTR/A* i *ermB*. Działanie tych enzymów wpływa hamująco na wiązanie do podjednostki 50S rybosomu nie tylko makrolidów, lecz również linkozamidów (klindamycyny) i streptograminu typu B. W wyniku aktywności produktów genów *erm* występuje wspomniane zjawisko oporności krzyżowej zwane MLS_B (*macrolides lincosamides streptogramins B*), a ekspresja oporności MLS_B może mieć charakter indukcyjny ($iMLS_B$) lub konstytutywny ($cMLS_B$). Oporność typu MLS_B ma poważne konsekwencje terapeutyczne w odniesieniu do zakażeń inwazyjnych wywołanych przez GAS, bowiem uniemożliwia zastosowanie najbardziej skutecznego schematu leczenia tj. penicyliny z klindamycyną.

Paciorkowce grupy A są również w stanie aktywnie usuwać antybiotyki z komórki bakteryjnej (*efflux*). Mechanizm ten jest uwarunkowany obecnością transporterów MSF (*major facilitator superfamily*) kodowanych przez geny *mef*. Aktywność tego mechanizmu warunkuje jedynie oporność na makrolidy 14- i 15-członowe (erytromycyna, klarytromycyna, roksytromycyna i azytromycyna), a wynikający z tego fenotyp oporności określa się, jako oporność typu M.

Oporność na makrolidy w wielu przypadkach koreluje z opornością na tetracykliny – antybiotyki, których bakteriostatyczne działanie polega, podobnie jak w przypadku makrolidów, na hamowaniu biosyntezy białka. Mają one zdolność wiązania się z białkami podjednostki 30S rybosomu, blokując przyłączanie się aminoacylo-tRNA do miejsca akceptorowego A w kompleksie mRNA-rybosom [20]. Antybiotyki te wprowadzono do lecznictwa w latach 50-tych XX wieku, kiedy niewiele było na rynku tego typu leków, więc stanowiły ważną alternatywę dla penicylin. To zaowocowało ich szerokim stosowaniem i to nie tylko w medycynie, ale także w weterynarii, i produkcji roślinnej [38]. Po raz pierwszy szczepy *S. pyogenes* odporne na tetracyklinę pojawiły się niedługo po wprowadzeniu leku w roku 1954 w Wielkiej Brytanii [1]. W latach 70-tych XX wieku w wielu krajach poziom oporności GAS na tetracyklinę był bardzo wysoki i wynosił nawet 80% [52]. W badaniach prowadzonych w Polsce poziom oporności na tetracyklinę wśród izolatów GAS pochodzących z różnych zakażeń był wysoki i wynosił ponad 40%. Od tego czasu obserwowano dramatyczne narastanie oporności na tę grupę antybiotyków, która rozprzestrzeniała się głównie przy udziale mobilnych elementów genetycznych [68].

Oporność na tetracykliny jest związana przede wszystkim z dwoma mechanizmami: aktywnym usuwa-

niem antybiotyku z komórki na zewnątrz do środowiska oraz wytwarzaniem białek chroniących rybosomy (*ribosomal protection proteins*, RPPs). Pierwszy z wymienionych mechanizmów występuje przede wszystkim u bakterii Gram-ujemnych [17, 18]. Drugi rodzaj oporności jest charakterystyczny dla *S. pyogenes* a białka RPPs kodowane są przez geny *tetM* i *tetO* [20].

Zaobserwowano częste współwystępowanie genów oporności na makrolidy i tetracykliny, korelacja najczęściej dotyczy występowania genów *ermB* z *tetM* oraz *ermTR/A* z *tetM* i *tetO*. Zjawisko to wiąże się z występowaniem horyzontalnego transferu wśród szczepów GAS. Zidentyfikowano sekwencje transpozonów zintegrowanych z genomami GAS zawierających wymienione geny oporności [62]. Wykazano również, że w przypadku fenotypu M oraz fenotypu $iMLS_B$ determinantem oporności na erytromycynę często towarzyszy gen *tetO*, w przeciwieństwie do związanego najczęściej z fenotypem $cMLS_B$ genu *tetM*. Szczególnie użyteczne jest poszukiwanie kodującego tetracyklinę genu *tetM*, będącego markerem silnie rozprzestrzenionych w genomach bakteryjnych, integracyjnych elementów koniugacyjnych ICE z rodziny Tn916 [61]. W przypadku fenotypu $cMLS_B$, występowanie wspomnianej funkcjonalnej lub wyciszonej determinanty oporności na tetracyklinę, świadczy właśnie o zaistniałym włączeniu genu *ermB* do pochodnych Tn916 – Tn1545, Tn3703, Tn1116 czy Tn3872 [77]. Innym unikatowym elementem, przenoszącym informację o oporności na tetracyklinę i erytromycynę jest *tetO-mefA*. Powstał on poprzez insercję genu *tetO*, a także transpozonu Tn1207.1 zawierającego gen *mefA*, do profaga włączonego w chromosom bakteryjny [36]. Z kolei oporność na antybiotyki inne niż tetracyklina, jest markerem elementu ICE 10750-RD.2, zawierającego gen *ermA*, flankowany przez geny oporności na tetronazynę i spektynomycynę [9, 77].

W ciągu minionej dekady, intensywnie badano otoczenie genów *mef/erm* oraz mechanizmy ich ekspansji. Scharakteryzowano w ten sposób szereg elementów transpozycyjnych związanych z opornością na erytromycynę, o charakterze profagów, ICE, transpozonów a nawet plazmidów. Często obserwowana różnica w organizacji genetycznej poszczególnych ICEs względem reszty chromosomu, może wskazywać, że przenoszący informację o oporności element wywodzi się od donora niespokrewnionego z GAS [9]. Pozwala to na rozprzestrzenianie się lekooporności nie tylko w obrębie populacji GAS, lecz także pomiędzy przedstawicielami różnych patogennych gatunków z rodzajów *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* a nawet *Clostridium* [4, 77, 79]. Inne gatunki bakteryjne zajmujące typowe dla *S. pyogenes* nisze mogą być jednocześnie rezerwuarami nowych determinantów oporności. Jak do tej pory, w genomach GAS wykazano występowanie szeregu mobilnych elementów genetycznych przenoszących oporność na makrolidy takich jak Tn917, Tn3872,

Tn6002, Tn1116 z *ermB*; ICE10750-RD.2, pRW35 z *ermA*; Tn1207.3, Φ 10394.4, Φ m46.1, oraz chimeryczny element szczepu M6 (transpozon wbudowany w profaga) niosący *mefA* [4, 77].

O dynamice horyzontalnego transferu genów może również świadczyć izolacja inwazyjnego szczepu *S. pyogenes*, którego indukowana oporność na erytromycynę warunkowana była zlokalizowanym na plazmidzie pRW35 genem *ermT*, typowym dla chromosomu paciorkowców grupy D, izolowanych na Tajwanie i USA [27, 80]. Odkrycie to dobitnie pokazuje, że analizując ekspansję lekooporności GAS nie można wykluczać żadnego rodzaju mobilnych elementów genetycznych uczestniczących w potencjalnym horyzontalnym transferze.

Narastanie oporności na makrolidy i linkozamidy, wśród szczepów GAS nakazuje poszukiwanie alternatywnych terapii, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń, zwłaszcza tych o charakterze inwazyjnym. Grupą antybiotyków o aktywności głównie wobec ziarenkowców Gram-dodatnich są oksazolidynony. Ich jedyny przedstawiciel linezolid, jest zalecany w leczeniu ciężkich zakażeń opornymi na metycylinę *S. aureus* czy opornymi na penicylinę *S. pneumoniae*. Antybiotyk ten posiada unikatowy mechanizm działania zaburzający biosyntezę białka bakterii. Blokuje on powstanie kompleksu inicjacyjnego, składającego się z podjednostek 50S i 30S oraz tRNA. W terapii zakażeń *S. pyogenes* istotny jest fakt, iż linezolid hamuje produkcję toksyn pirogennych w podobnym stopniu do klindamycyny [22].

Innymi antybiotykami stosowanymi w leczeniu zakażeń powodowanych przez ziarenkowce Gram-dodatnie są nowe fluorochinolony (IV generacja), których przedstawicielami są lewofloksacyna i moksifloksacyna. Jest to jedyna grupa chemioterapeutyków, których mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy DNA. Punktem uchwytu dla fluorochinolonów są dwa enzymy bakteryjne, regulujące przestrzenne ukształtowanie DNA: gyraza DNA i topoizomeraza IV. Wymienione fluorochinolony, lewofloksacyna i moksifloksacyna znalazły zastosowanie w leczeniu zakażeń układu oddechowego wywołanych przez paciorkowce [3]. W badaniach prowadzonych w Polsce wartości MIC linezolidu i fluorochinolonów dla izolatów GAS zarówno opornych na makrolidy, jak i pochodzących z inwazyjnych infekcji wskazywały na ich wrażliwość na wymienione powyżej chemioterapeutyki [73, 74].

6. Profilaktyka zakażeń *S. pyogenes*

Mimo wieloletnich badań ukierunkowanych na opracowanie metod efektywnego zapobiegania zakażeniom powodowanym przez GAS, wciąż brakuje komercyjnie dostępnej szczepionki, mogącej uchronić przed zakażeniem.

Wybór składu i produkcja szczepionki jest procesem złożonym i długoletnim, toteż niezwykle istotną kwestią jest odpowiedni dobór białek o właściwościach immunogennych. W przypadku GAS, od wielu lat promowana jest strategia wykorzystania w tym celu białka M ze względu na ochronne właściwości przeciwciał przeciwko temu białku [12, 24]. Ze względu na istnienie bardzo wielu antygenowo odmiennych białek M proponuje się wykorzystanie w szczepionce najczęściej występujących serotypów *S. pyogenes*, odpowiedzialnymi za zapalenie gardła i migdałków podniebiennych oraz infekcje inwazyjne. W badaniu II fazy szczepionki StreptAvax (ID Biomedical) po roku obserwacji klinicznej oceniono, że szczepionka ta wywołuje swoistą odpowiedź immunologiczną u zdrowych osób dorosłych nie powodując przy tym poważnych objawów niepożądanych [38, 49].

Stworzenie szczepionki wykorzystującej fragmenty białka M jest jednak zadaniem nieco kontrowersyjnym ze względu na dwa główne problemy. Pierwszym problemem jest ciągła ewolucja i powstawanie nowych typów białka M, przeciwko którym szczepionka o ściśle ustalonym składzie będzie nieskuteczna. Ważniejszym jednak problemem jest geograficznie zróżnicowana i nierównomierna dystrybucja szczepów [15]. Oszacowano, że opracowana 26 walentna szczepionka zapewniłaby odporność przeciwko większości chorobotwórczych izolatów w krajach wysoko rozwiniętych (Europa, Ameryka Północna, Australia, Nowa Zelandia, Japonia i Hong Kong), średni poziom odporności w Azji i na Środkowym Wschodzie oraz niski poziom w Afryce i na wyspach Pacyfiku [69]. Różnice w strukturze wariantów w różnych regionach geograficznych wskazują na konieczność produkcji kilku rodzajów szczepionek, które będą przystosowane do użycia na konkretnym kontynencie. Alternatywą może być opracowanie szczepionki zawierającej antygeny o niewielkiej zmienności wspólne dla wszystkich szczepów i powodujące powstawanie przeciwciał ochronnych,

Do czasów poznania sekwencji pierwszego genomu GAS, wybór czynników mogących stanowić potencjalny antygen szczepionkowy odbywał się głównie na drodze analiz serologicznych. Pulę wybranych w taki sposób czynników znacznie wzbogaciły dopiero badania molekularne GAS, analizujące szereg nowopoznanych białek zewnątrzkomórkowych i powierzchniowych lipoprotein [41, 63]. W wyniku systematycznych badań wykryto cząsteczki, których właściwości sugerują ich potencjalne wykorzystanie w składzie szczepionki. Przykładowo, 23 nowo zidentyfikowane białka mogące być potencjalnymi składnikami szczepionki reagują z surowicą osób, które przeszły infekcję GAS – co oznacza, że są wytwarzane podczas infekcji. Białka te znajdują się na powierzchni ściany komórkowej co czyni je bardziej dostępnymi dla przeciwciał i dobrymi celami dla szczepionki [19]

Przykładem badanego białka jako składnika potencjalnej szczepionki przeciwko GAS jest zewnątrzkomórkowa proteaza SpyCEP. Eksperymenty prowadzone na modelach zwierzęcych dają pozytywne efekty, zarówno w przypadku iniekcji domięśniowej, jak i donosowej. Dodatkową zaletą wykorzystania SpyCEP jest fakt, że jego homologi zidentyfikowano również w innych gatunkach paciorkowców, w tym *S. equi* (SeCEP), a także będącego przyczyną zoonoz, *S. iniae* (CepI) [71, 76, 81]. Innymi składnikami szczepionek mogą być np: peptydaza C5a [66], czy konserwatywny peptyd J8 białka M [5]. Ostatnio przy użyciu metod proteomicznych zidentyfikowane kolejne 40 białek, które mogą zostać użyte w konstrukcji szczepionki przeciw GAS. Do silnych immunogenów zakwalifikowano streptolizynę O, białko powierzchniowe (SPy0269 w szczepie SF370), białko zewnątrzkomórkowe (SPy0019 w szczepie SF370) i białko należące do rodziny internalin A (SPy1361 w szczepie SF370) [7].

7. Podsumowanie

Narastająca oporność na antybiotyki wśród szczepów *S. pyogenes* uwydatnia konieczność prowadzenia aktywnego monitorowania lekowrażliwości, w oparciu zarówno o metody fenotypowe, jak i genetyczne w celu identyfikacji rezerwuarów opornych drobnoustrojów. Zastosowanie molekularnych technik takich jak MLST, MLVA czy PFGE do ustalania pokrewieństwa między szczepami, badanie występowania genów oporności na różne antybiotyki, ich lokalizacji oraz dróg przenoszenia jest ważnym kierunkiem badań w mikrobiologii.

Wysoka różnorodność i zmienność szczepów GAS wskazuje na możliwość szybkiej selekcji coraz to nowszych klonów o podwyższonej wirulencji. Złożoność procesów wiodących do umiejscowienia genów warunkujących oporność na chemioterapeutyki i dalszej wędrówki tychże genów jest jeszcze jednym dowodem na niezwykłą plastyczność genetyczną *S. pyogenes*.

Od wielu lat podejmowane są próby opracowania swoistej wysoce immunogennej i bezpiecznej szczepionki przeciwko szczepom GAS. Obecnie dużą nadzieję w zwalczaniu rozprzestrzeniania infekcji GAS budzi wykorzystanie, zidentyfikowanych za pomocą tzw. „reverse vaccinology”, nowych cząsteczek białek zewnątrzkomórkowych *S. pyogenes* jako potencjalnych składników szczepionki.

Piśmiennictwo

- Akiba T., Koyama K., Ishiki Y., Kimura S., Fukushima T.: On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Jpn. J. Microbiol.* **4**, 219–227 (1960)
- Alos J.L., Aracil B., Oteo J., Gomez-Garcés J.L.: Significant increase in the prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin- and miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 333–337 (2003)
- Amabile-Cuevas C.F., Hermida-Escobedo C., Vivar R.: Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin by E-test against *Streptococcus pyogenes*. *Clin. Infect. Dis.* **32 Suppl. 1**, S30–32 (2001)
- Banks D.J., Porcella S.F., Barbian K.D., Martin J.M., Musser J.M.: Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.* **188**, 1898–1908 (2003)
- Batzloff M.R., Hayman W.A., Davies M.R., Zeng M., Pruksakorn S., Brandt E.R., Good M.F.: Protection against group A streptococcus by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8- and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection. *J. Infect. Dis.* **187**, 1598–1608 (2003)
- Beall B., Facklam R., Thompson T.: Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 953–958 (1996)
- Bensi G., Mora M., Tuscano G., Biagini M., Chiarot E., Bombaci M., Capo S., Falugi F., Manetti A.G., Donato P., Swennen E., Gallotta M., Garibaldi M., Pinto V., Chiappini N., Musser J.M., Janulczyk R., Mariani M., Scarselli M., Telford J.L., Grifantini R., Norais N., Margarit I., Grandi G.: Multi high-throughput approach for highly selective identification of vaccine candidates: the group A streptococcus case. *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111 015693 (2012)
- Beres S.B., Carroll R.K., Shea P.R., Sitkiewicz I., Martinez-Gutierrez J.C., Low D.E., McGeer A., Willey B.M., Green K., Tyrrell G.J., Goldman T.D., Feldgarden M., Birren B.W., Fofanov Y., Boos J., Wheaton W.D., Honisch C., Musser J.M.: Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4371–4376 (2010)
- Beres S.B., Musser J.M.: Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One*, **2**, e800 (2007)
- Bergman M., Huikko S., Pihlajamaki M., Laippala P., Palva E., Huovinen P., Seppala H.: Effect of macrolide consumption on erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Finland in 1997–2001. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1251–1256 (2004)
- Bessen D.E.: Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 581–593 (2009)
- Bisno A.L., Rubin F.A., Cleary P.P., Dale J.B.: Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles-report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1150–1156 (2005)
- Borek A.L., Obszanska K., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence*, **3**, (2012)
- Borek A.L., Wilemska J., Izdebski R., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: A new rapid and cost-effective method for detection of phages, ICEs and virulence factors encoded by *Streptococcus pyogenes*. *Pol. J. Microbiol.* **60**, 187–201 (2011)
- Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M.: The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 685–694 (2005)
- Carrico J.A., Silva-Costa C., Melo-Cristino J., Pinto F.R., de Lencastre H., Almeida J.S., Ramirez M.: Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2524–2532 (2006)
- Chopra I., Roberts M.: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260; second page, table of contents (2001)

18. Clermont D., Chesneau O., De Cespedes G., Horaud T.: New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of tet(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 112–116 (1997)
19. Cole J.N., Ramirez R.D., Currie B.J., Cordwell S.J., Djordjevic S.P., Walker M.J.: Surface analyses and immune reactivities of major cell wall-associated proteins of group A streptococcus. *Infect. Immun.* **73**, 3137–3146 (2005)
20. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E.: Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–3681 (2003)
21. Cornaglia G., Ligozzi M., Mazzariol A., Valentini M., Orefici G., Fontana R.: Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993–1995. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 339–342 (1996)
22. Coyle E.A., Cha R., Rybak M.J.: Influences of linezolid, penicillin, and clindamycin, alone and in combination, on streptococcal pyrogenic exotoxin A release. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1752–1755 (2003)
23. Cunningham M.W.: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 470–511 (2000)
24. Dale J.B., Penfound T., Chiang E. Y., Long V., Shulman S.T., Beall B.: Multivalent group A streptococcal vaccine elicits bactericidal antibodies against variant M subtypes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 833–836 (2005)
25. Daneman N., Green K.A., Low D.E., Simor A.E., Willey B., Schwartz B., Toye B., Jessamine P., Tyrrell G.J., Krajden S., Ramage L., Rose D., Schertzberg R., Bragg D., McGeer A.: Surveillance for hospital outbreaks of invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada, 1992 to 2000. *Ann. Intern. Med.* **147**, 234–241 (2007)
26. Davies H.D., McGeer A., Schwartz B., Green K., Cann D., Simor A.E., Low D.E.: Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group. *N. Engl. J. Med.* **335**, 547–554 (1996)
27. DiPersio L.P., DiPersio J.R., Frey K.C. i Beach J.A.: Prevalence of the erm(T) gene in clinical isolates of erythromycin-resistant group D *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1567–1569 (2008)
28. Efstratiou A.: Group A streptococci in the 1990s. *J. Antimicrob. Chemother.* **45 Suppl.**, 3–12 (2000)
29. Enright M.C., Spratt B.G., Kalia A., Cross J.H., Bessen D.E.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infect Immun* **69**, 2416–2427 (2001)
30. Facklam R.: What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 613–630 (2002)
31. Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., Lovgren M., Martin D., Schwartz B., Tottolian A., Bessen D., Hollingshead S., Rubin E., Scott J., Tyrrell G.: emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 247–253 (1999)
32. Facklam R.F., Martin D.R., Lovgren M., Johnson D.R., Efstratiou A., Thompson T.A., Gowan S., Kriz P., Tyrrell G.J., Kaplan E., Beall B.: Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm103 to emm124. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 28–38 (2002)
33. Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G.: eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **186**, 1518–1530 (2004)
34. Feng L., Lin H., Ma Y., Yang Y., Zheng Y., Fu Z., Yu S., Yao K., Shen X.: Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **67**, 369–375 (2010)
35. Gillespie S.H.: Failure of penicillin in *Streptococcus pyogenes* pharyngeal infection. *Lancet*, **352**, 1954–1956 (1998)
36. Giovanetti E., Brencciani A., Vecchi M., Manzin A., Varaldo P.E.: Prophage association of mef(A) elements encoding efflux-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 445–451 (2005)
37. Horn D.L., Zabriskie J.B., Austrian R., Cleary P.P., Ferretti J.J., Fischetti V.A., Gotschlich E., Kaplan E.L., McCarty M., Opal S.M., Roberts R.B., Tomasz A., Wachtfogel Y.: Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1341–1345 (1998)
38. Hu M.C., Walls M.A., Stroop S.D., Reddish M.A., Beall B., Dale J.B.: Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect. Immun.* **70**, 2171–2177 (2002)
39. Jacob S.E., Lloyd C.A., Menon T.: cMLS and M phenotypes among *Streptococcus pyogenes* isolates in Chennai. *Indian. J. Med. Microbiol.* **24**, 147–148 (2006)
40. Lancefield R.C.: Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* **89**, 307–313 (1962)
41. Lei B., Liu M., Chesney G.L., Musser J.M.: Identification of new candidate vaccine antigens made by *Streptococcus pyogenes*: purification and characterization of 16 putative extracellular lipoproteins. *J. Infect. Dis.* **189**, 79–89 (2004)
42. Lewin A.B., Storch E.A., Mutch P.J., Murphy T.K.: Neurocognitive functioning in youth with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **23**, 391–398 (2011)
43. Littauer P., Caugant D.A., Sangvik M., Hoiby E.A., Sundsfjord A., Simonsen G.S.: Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1896–1899 (2006)
44. Lowbury E.J., Hurst L.: The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin, and spiramycin. *J. Clin. Pathol.* **12**, 163–169 (1959)
45. Macris M.H., Hartman N., Murray B., Klein R.F., Roberts R.B., Kaplan E.L., Horn D., Zabriskie J.B.: Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 377–381 (1998)
46. Martin J.M., Green M.: Group A streptococcus. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **17**, 140–148 (2006)
47. Martin J.M., Green M., Barbadora K.A., Wald E.R.: Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state. *Pediatrics*, **114**, 1212–1219 (2004)
48. McGregor K.F., Spratt B.G., Kalia A., Bennett A., Bilek N., Beall B., Bessen D.E.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J. Bacteriol.* **186**, 4285–4294 (2004)
49. McNeil S.A., Halperin S.A., Langley J.M., Smith B., Warren A., Sharratt G.P., Baxendale D.M., Reddish M.A., Hu M.C., Stroop S.D., Linden J., Fries L.F., Vink P.E., Dale J.B.: Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1114–1122 (2005)
50. Michos A.G., Bakoula C.G., Braoudaki M., Koutouzi F.I., Roma E.S., Pangalis A., Nikolopoulou G., Kirikou E., Syriopoulou V.P.: Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and emm types. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **64**, 295–299 (2009)
51. Murphy T.K., Storch E.A., Lewin A.B., Edge P.J., Goodman W.K.: Clinical factors associated with pediatric autoimmune

- neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections. *J. Pediatr.* **160**, 314–319 (2012)
52. Nakae M., Murai T., Kaneko Y., Mitsuhashi S.: Drug resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**, 427–428 (1977)
 53. Nielsen H.U., Hammerum A.M., Ekelund K., Bang D., Pallesen L.V., Frimodt-Moller N.: Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S. pyogenes*? *Microb. Drug Resist.* **10**, 231–238 (2004)
 54. Obszanska K., Borek A.L., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Multiple locus VNTR fingerprinting (MLVF) of *Streptococcus pyogenes*. *Virulence*, **3**, (2012)
 55. Obszanska K., Borek A. L., Izdebski R., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of *Streptococcus pyogenes*. *J. Microbiol. Methods.* **87**, 143–149 (2011)
 56. Olsen R.J., Sitkiewicz I., Ayeras A.A., Gonulal V.E., Cantu C., Beres S.B., Green N.M., Lei B., Humbird T., Greaver J., Chang E., Ragasa W.P., Montgomery C.A., Cartwright J., Jr., McGeer A., Low D.E., Whitney A.R., Cagle P.T., Blasdel T.L., DeLeo F.R., Musser J.M.: Decreased necrotizing fasciitis capacity caused by a single nucleotide mutation that alters a multiple gene virulence axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 888–893 (2010)
 57. Pechere J.C.: New perspectives on macrolide antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**, Suppl. 1, S93–97 (2001)
 58. Reinert R.R., Luttkick R., Sutcliffe J.A., Tait-Kamradt A., Cil M.Y., Schorn H.M., Bryskier A., Al-Lahham A.: Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**, 1369–1373 (2004)
 59. Richardson L.J., Tong S.Y., Towers R.J., Huygens F., McGregor K., Fagan P.K., Currie B.J., Carapetis J.R., Giffard P.M.: Preliminary validation of a novel high-resolution melt-based typing method based on the multilocus sequence typing scheme of *Streptococcus pyogenes*. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1426–1436 (2011)
 60. Richter S.S., Heilmann K.P., Dohrn C.L., Beekmann S.E., Riahi F., Garcia-de-Lomas J., Ferech M., Goossens H., Doern G.V.: Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 603–611 (2008)
 61. Roberts A.P., Mullany P.: A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* **17**, 251–258 (2009)
 62. Robinson D.A., Sutcliffe J.A., Tewodros W., Manoharan A., Bessen D.E.: Evolution and global dissemination of macrolide-resistant group A streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2903–11 (2006)
 63. Rodriguez-Ortega M.J., Norais N., Bensi G., Liberatori S., Capo S., Mora M., Scarselli M., Doro F., Ferrari G., Garaguso I., Maggi T., Neumann A., Covre A., Telford J.L., Grandi G.: Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat. Biotechnol.* **24**, 191–197 (2006)
 64. Rubio V., Valdezate S., Alvarez D., Villalon P., Medina M.J., Salcedo C., Saez-Nieto J.A.: Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994–2006). *BMC Microbiol.* **12**, 215 (2012)
 65. Schuchat A., Hilger T., Zell E., Farley M.M., Reingold A., Harrison L., Lefkowitz L., Danila R., Stefonek K., Barrett N., Morse D., Pinner R.: Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 92–99 (2001)
 66. Shet A., Kaplan E., Johnson D., Cleary P. P.: Human immunogenicity studies on group A streptococcal C5a peptidase (SCPA) as a potential vaccine against group A streptococcal infections. *Indian. J. Med. Res.* **119**, Suppl., 95–98 (2004)
 67. Silva-Costa C., Ramirez M., Melo-Cristino J.: Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and emm types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2109–2111 (2005)
 68. Skoczynska A., Kadlubowski M., Wasko I., Fiett J., Hryniewicz W.: Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 377–383 (2007)
 69. Steer A.C., Batzloff M.R., Mulholland K., Carapetis J.R.: Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **22**, 544–552 (2009)
 70. Strus M., Drzewiecki A., Chmielarczyk A., Tomusiak A., Romanek P., Kosowski K., Kochan P., van der Linden M., Luttkick R., Heczko P.B.: Microbiological investigation of a hospital outbreak of invasive group A streptococcal disease in Krakow, Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 1442–1447 (2010)
 71. Sumbly P., Zhang S., Whitney A.R., Falugi F., Grandi G., Graviss E.A., Deleo F.R., Musser J.M.: A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus* alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect. Immun.* **76**, 978–985 (2008)
 72. Szczypa K., Hryniewicz W.: Zakażenia *Streptococcus pyogenes* nabyte w szpitalu. *Nowa Klinika*, **16**, 717 (2009)
 73. Szczypa K., Sadowy E., Izdebski R., Hryniewicz W.: A rapid increase in macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Poland during 1996–2002. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 828–831 (2004)
 74. Szczypa K., Sadowy E., Izdebski R., Strakova L., Hryniewicz W.: Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3975–3979 (2006)
 75. Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Mechanizmy wirulencji *Streptococcus pyogenes*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 3–15 (2012)
 76. Turner C.E., Kurupati P., Wiles S., Edwards R.J., Sriskandan S.: Impact of immunization against SpyCEP during invasive disease with two streptococcal species: *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equi*. *Vaccine*, **27**, 4923–4929 (2009)
 77. Valardo P. E., Montanari M.P., Giovanetti E.: Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 343–353 (2009)
 78. Weiss K., De Azavedo J., Restieri C., Galarneau L.A., Gourdeau M., Harvey P., Paradis J.F., Salim K., Low D.E.: Phenotypic and genotypic characterization of macrolide-resistant group A *Streptococcus* strains in the province of Quebec, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 345–348 (2001)
 79. Wondrack L., Massa M., Yang B.V., Sutcliffe J.: Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**, 992–998 (1996)
 80. Woodbury R.L., Klammer K.A., Xiong Y., Bailiff T., Glennen A., Bartkus J.M., Lynfield R., Van Beneden C., Beall B.W.: Plasmid-Borne erm(T) from invasive, macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1140–1143 (2008)
 81. Zinkernagel A.S., Timmer A.M., Pence M.A., Locke J.B., Buchanan J.T., Turner C.E., Mishalian I., Sriskandan S., Hanski E., Nizet V.: The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microbe*, **4**, 170–178 (2008)

Podziękowania

Artykuł powstał dzięki finansowemu wsparciu z grantu NCN N N401 536140, działalności statutowej NIL (DS.5.82 i DS 5.67), sieci monitorowania pozaszpitalnych zakażeń inwazyjnych BiNet, oraz Narodowemu Programowi Ochrony Antybiotyków (NPOA-Moduł)

Zofia Bakuła^{1*}, Radosław Stachowiak¹, Jarosław Wiśniewski¹,
Ludomira Granicka² i Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

²Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Wpłynęło w czerwcu 2013 r.

Spis treści: 1. Wprowadzenie. 2. Metody immobilizacji komórek. 2.1. Unieruchomienie bez nośnika. 2.2. Unieruchomienie na powierzchni nośnika. 2.3. Unieruchomienie wewnątrz nośnika. 2.3.1. Pułapkowanie. 2.3.2. Kapsułkowanie. 2.3.3. Nanopłaszczenie. 3. Historia zastosowania nośników do immobilizacji materiału biologicznego. 4. Immobilizacja w zastosowaniach biomedycznych. 4.1. Drogi podawania terapeutyków przy użyciu unieruchomionych komórek. 4.2. Właściwości kapsułek wykorzystywanych we wszczepieniach. 4.2.1. Struktura materiału nośnika. 4.2.2. Biogodność. 4.2.3. Wytrzymałość. 4.2.4. Właściwości chemiczne. 4.3. Właściwości kapsułek wykorzystywanych w terapii doustnej. 4.4. Immobilizowany materiał biologiczny. 4.5. Biomedyczne zastosowania immobilizowanych komórek. 4.5.1. Wykorzystanie unieruchomionych komórek eukariotycznych. 4.5.2. Wykorzystanie unieruchomionych drobnoustrojów. 5. Podsumowanie

Cell immobilization – biomedical significance

Abstract: Cell encapsulation, which aims to entrap viable cells within the confines of semi-permeable membranes, represents one of the current leading methodologies aimed at the delivery of biological factors to patients for the treatment of multiple diseases. The pores of the membrane are suitably sized to allow the entry of small molecules such as oxygen, nutrients and electrolytes into the capsule and egress of metabolites and small bioactive molecules from the capsule. Entrapment of cells in physical membranes has been practiced since the early 1930s. Numerous encapsulation techniques have been developed over the years and they are classified as entrapment, microencapsulation (usually small spherical devices), macroencapsulation (hollow fiber membranes) and nanocoating. Cell encapsulation technologies were initially directed towards the transplantation of cells across an immunological barrier without the use of immunosuppressant drugs. Some encapsulated microorganisms may carry a transfected human gene, and thus become a source of valuable regulatory factors or anti-tumor factors. Such factors released in strategic locations may direct or modify the biological processes in the eukaryotic organism in biomedical applications. Membranes with immobilized cells can be also used as a novel method for oral drug delivery.

Contents: 1. Introduction. 2. Methods of cell immobilization. 2.1. Immobilization without carrier. 2.2. Immobilization on carrier. 2.3. Immobilization in carrier. 2.3.1. Entrapment. 2.3.2. Encapsulation. 2.3.3. Nanocoating. 3. The history of using membranes for immobilization. 4. Encapsulation in biomedical applications. 4.1. Methods of drug delivery using encapsulated cells. 4.2. Membrane properties important for implantation. 4.2.1. Structure of carrier material. 4.2.2. Biocompatibility. 4.2.3. Durability. 4.2.4. Chemical properties. 4.3. Membrane properties for oral drug delivery. 4.4. Immobilized biological material. 4.5. Biomedical applications of encapsulated cells. 4.5.1. Use of encapsulated eukaryotic cells. 4.5.2. Use of encapsulated microorganisms. 5. Summary

Słowa kluczowe: immobilizacja, pułapkowanie, kapsułkowanie, nanopłaszczenie, terapia biohybrydowa

Key words: immobilization, entrapment, encapsulation, nanocoating, biohybrid therapy

1. Wprowadzenie

Znanych jest wiele chorób wywołanych nieprawidłowym metabolizmem cząsteczek w organizmie bądź ich nieodpowiednim stężeniem [77]. Skuteczne leczenie tego typu schorzeń wymaga dostarczenia biologicznie aktywnych cząstek terapeutycznych do właściwego miejsca w organizmie i ich uwalniania, najkorzystniej, w kontrolowany sposób. Systemy opierające się na immobilizowanych komórkach w półprzepuszczalnych nośnikach mających postać implantu dają medycynie nowe możliwości i pozwalają na produkcję substancji, których organizm sam produkować nie może. Unieruchamiać można szerokie spektrum komórek, jednocześnie

nie redukując niezbędną dawkę podawanych leków immunosupresyjnych, minimalizując skutki uboczne i poprawiając jakość życia pacjentów [53]. Immobilizacja komórek ma wiele zalet w porównaniu z immobilizacją białek. Jest mniej kosztowna, pozwala na długotrwałe i kontrolowane dostarczanie cząsteczek produkowanych *de novo*, a gdy implant ulegnie uszkodzeniu, toksyczność spowodowana wysokim stężeniem leku jest znacznie mniejsza. Unieruchamianie materiału biologicznego może być także wykorzystywane, jako nowa metoda doustnego podawania leków i szczepionek [62]. Jest ona szczególnie korzystna w porównaniu z doustnym podawaniem immobilizowanych białek, które często ulegają uszkodzeniu podczas wędrówki przez układ trawienny.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: zofiabakula@biol.uw.edu.pl

2. Metody immobilizacji komórek

Immobilizacja drobnoustrojów jak i komórek eukariotycznych polega na częściowym lub całkowitym ograniczeniu ich swobodnego ruchu przy jednoczesnym zapewnieniu im dostępu do składników odżywczych i odpływu produktów przemiany. Istnieje wiele klasyfikacji metod unieruchamiania, a najpopularniejsza wyróżnia: (i) unieruchomienie bez nośnika, (ii) unieruchomienie na powierzchni nośnika, (iii) unieruchomienie wewnątrz nośnika [74].

2.1. Unieruchomienie bez nośnika

Unieruchomienie bez nośnika wykorzystuje naturalną (samoagregacja) bądź indukowaną zdolność komórek do tworzenia skupisk (indukowana flokulacja komórek i sieciowanie przestrzenne).

Samoagregacja możliwa jest dzięki wydzielaniu przez komórki związków, które umożliwiają im wzrost w postaci kłaczek czy granulek (np. polimukosacharydów), a tworzeniu skupisk sprzyja duża koncentracja biomasy. Zdolność komórek do wzajemnego łączenia się może być zwiększana np. poprzez stosowanie odpowiednich podłoży, regulację pH, temperatury czy stężenia tlenu, a także poprzez dodawanie polielektrolitów. Manipulowanie wyżej wymienionymi czynnikami w celu umożliwienia tworzenia skupień i konglomeratów nazywane jest indukowaną flokulacją. Materiał biologiczny otrzymany zarówno w procesach samoagregacji jak i flokulacji charakteryzuje się jednak małą wytrzymałością mechaniczną, co ogranicza możliwości jego zastosowania.

Sieciowanie przestrzenne to wiązanie komórek różnymi substancjami mogącymi reagować z grupami funkcyjnymi osłon komórkowych np. aldehydem glutarowym, chlorkiem cyjanurowym bądź heksametylocyaniną. Wzajemne sieciowanie daje zwykle dosyć trwałe biomateriały, jednak może prowadzić do częściowej utraty aktywności komórek i utrudniać dyfuzję substratów.

2.2. Unieruchomienie na powierzchni nośnika

W obrębie metod unieruchamiania na powierzchni nośnika wyróżnia się adsorpcję i adhezję oraz wiązanie kowalencyjne.

Adsorpcja i adhezja oparte są na wiązaniach jonowych, wodorowych, hydrofobowych, siłach elektrostatycznych, siłach van der Waalsa lub kombinacjach tych sił. Nośnik (np. celulozę, drewno, szkło porowate, tlenki metali, syntetyczne polimery) wprowadza się do roztworu z materiałem biologicznym i pozostawia na pewien czas, bez mieszania lub z mieszaniem, w celu osadzenia się komórek. Skuteczność unieruchamiania zależy od rodzaju matrycy, typu zastosowanych komórek,

ich metabolizmu i cech środowiska [6]. Wadą tej metody jest uzyskiwanie stosunkowo niskiego stężenia biomasy na jednostkę objętości bioreaktora.

Wiązanie kowalencyjne polega na utworzeniu wiązań chemicznych takich jak wiązania estrowe czy peptydowe między grupami funkcyjnymi składników osłon komórek a nośnikiem (siła przyczepu jest tu wyższa niż w przypadku adsorpcji i adhezji). W metodzie tej stosuje się czynnik wiążący (np. aldehyd glutarowy) i nośnik (np. ziemię okrzemkową, szkło porowate, pochodne celulozy, akrylany, skały wulkaniczne, bawełnę) [6]. Aby poprawić efektywność immobilizacji sugeruje się obniżenie siły elektrostatycznego odpychania komórka – nośnik, bądź nadaje się powierzchni komórki lub nośnika odpowiedni ładunek (np. poprzez zastosowanie polietylenoiminy). Zarówno czynniki wiążące jak i stosowane modyfikacje nośnika muszą być indywidualnie dobierane, gdyż mogą one redukować żywotność komórek oraz powodować opory dyfuzyjne.

W metodach wykorzystujących wiązanie do powierzchni nośnika należy zwracać szczególną uwagę na zmiany środowiska (np. spadek pH może powodować odklejenie się komórek). Ponadto obserwuje się częściowe uwalnianie materiału biologicznego związane z autolizą komórek z niższych warstw, turbulencjami czy przepływem fazy ciekłej.

2.3. Unieruchomienie wewnątrz nośnika

Unieruchomienie materiału wewnątrz nośnika polega na fizycznym zamknięciu komórek w matrycy. Drobnoustroje zamknięte można wewnątrz półprzepuszczalnej membrany w postaci kapsułki (nanokapsułkowanie i mikrokapsułkowanie) bądź kapilary (makrokapsułkowanie) lub pułapkować w porowatym nośniku [75].

2.3.1. Pułapkowanie

Pułapkowanie (inkluzyja) polega na uwięzieniu komórek w trójwymiarowej matrycy, której rozmiar jest istotnie większy od rozmiarów komórek (najczęściej są to kuleczki o średnicy 0,3–3 mm) [6]. Materiał biologiczny można wymieszać z roztworem nośnika (monomerem bądź nieusieciowanym polimerem) i środka sieciującego, a następnie układ taki poddać polimeryzacji. Do produkcji matryc pełnożelowych wykorzystuje się związki chemiczne pochodzenia naturalnego bądź syntetyczne, które żelują poprzez wytworzenie między cząsteczkami wiązań wodorowych, hydrofobowych, kowalencyjnych lub oddziaływań jonowych. Muszą one spełniać pewne wymagania: nie być toksyczne względem unieruchamianych komórek, tworzyć żel w łagodnych warunkach (temperatura, pH, nietoksyczne odczynniki) oraz mieć odpowiednie właściwości mechaniczne [34]. W biotechnologii materiałem najczęściej stosowanym

do pułapkowania jest alginian sodu (jednowartościowa sól kwasu alginianowego) – liniowy kopolimer zbudowany z dwóch typów monomerów: kwasu β -D-mannurowego (M) i α -L-guluronowego (G), pozyskiwany z morskich brunatnic.

2.3.2. Kapsułkowanie

Kapsułkowanie polega na otaczaniu rdzenia ściankami uformowanymi z jednej lub kilku substancji okrywających [2]. Rdzeń stanowi zwykle od 10 do 90% ogólnej masy kapsułki. Może nim być substancja lub mieszanina substancji w postaci stałej, ciekłej lub gazowej. Materiałem ścianek mogą być związki naturalne bądź syntetyczne [17]. Technikami wykorzystywanymi do formowania kapsułek są: odparowanie rozpuszczalnika, żelowanie za pomocą jonów, suszenie rozpyłowe, powlekanie, ekstruzja, koacerwacja, denaturacja termiczna i suszenie sublimacyjne [56]. Kapsułki zwykle zapobiegają ucieczce komórek z nośnika, jednocześnie nie zaburzając przepływu małowcząsteczkowych produktów i substratów [17].

Makrokapsułki zwane też membranami kapilarnymi mają cylindryczny kształt, średnice wewnętrzną od 0,5 do 1,5 mm i długość od 1 do 10 cm [37]. Membrany kapilarne wytwarzane są między innymi z polipropylenu, polimeru z grupy poliolefin, zbudowanego z merów o wzorze: $-(CH_2CH(CH_3))-$. Polimer ten występuje w trzech podstawowych formach stereoisomerycznych: ataktycznej, izotaktycznej i syndiotaktycznej. Polipropylen izotaktyczny, w którym konfiguracja wszystkich centrów chiralności jest jednakowa, posiada najlepsze własności mechaniczne i jest najczęściej wykorzystywaną formą. Polipropylen jest termoplastyczny, wykazuje dużą odporność chemiczną na działanie soli, zasad, kwasów i rozpuszczalników organicznych. Charakteryzuje się także dobrą przepuszczalnością powietrza. Jest materiałem palnym, bezbarwnym, bezwonny i niewrażliwym na działanie wody (absorpcja wody wynosi od 0,01 do 0,03%). Polipropylen charakteryzuje się wysoką biogodnością i nie jest biodegradowalny [41]. Innymi materiałami stosowanymi do makrokapsułkowania jest m.in. polichlorek winylu, poliuretan czy polisulfon.

Mikrokapsułki są kuliste, a ich średnica zawiera się w przedziale 0,2–5000 μ m. Metodami najczęściej stosowanymi do ich wytwarzania są metody polegające na modyfikacji pełnych kapsułek żelowych. Modyfikacje te miały głównie na celu stworzenie dodatkowych warstw pokrywających, dzięki którym komórki wydostające się z żelu zatrzymują się w wolnej warstwie między kapsułką a płaszczem. Jedną z nich wykorzystywała pełne alginianowe kulki żelowe, które umieszczane były w roztworze poli-L-lizyny. Koacerwacja dwóch polielektrolitów, ujemnie naładowanego algi-

nianu i dodatnio naładowanej poli-L-lizyny prowadziła do powstania membrany koacerwacyjnej. Następnie kapsułki pokrywano roztworem polietylenoiminy (ładunek ujemny), a rdzeń alginianowy upłynniano przy użyciu cytrynianu sodu [46]. Modyfikacja dokonana przez O'Shea i wsp., polegała na zastąpieniu polietylenoiminy kolejną warstwą alginianu w celu zwiększenia biokompatybilności kapsułek (w literaturze kapsułki uzyskane tą metodą, z upłynnionym bądź nieupłynnionym rdzeniem nazywane są kapsułkami APA – *alginate-poly-L-lysine-alginate*) [52]. Kapsułki APA zastosowane zostały między innymi do produkcji przeciwciał monoklonalnych na skalę przemysłową [55]. Przeszkodą w masowej produkcji okazała się jednak wysoka cena odczynników oraz skomplikowana metoda wytwarzania kapsułek (w procesie przemysłowym wiele kapsułek zostało uszkodzonych podczas upłynniania alginianowego rdzenia cytrynianem sodu) [53]. Inne modyfikacje polegały na zastępowaniu poli-L-lizyny innymi związkami np. chitozanem, bądź zwiększaniu liczby kolejnych warstw (np. kapsułki APAPA – alginian/poli-L-lizyna/alginian/poli-L-lizyna/alginian; APPPP – alginian/poli-L-lizyna/pektyna/poli-L-lizyna/pektyna; APCPA – alginian/poli-L-lizyna/chitozan/poli-L-lizyna/alginian) [54, 61, 64]. Mniej skomplikowane metody polegają na pokrywaniu kulek tłuszczami np. olejem palmowym [19]. Kulki takie miały być wykorzystywane do terapii doustnych, a dodatkowe pokrycie miało chronić immobilizowane bakterie przed szkodliwym działaniem soku żołądkowego. Hunkeler opisał metodę polegającą na koacerwacji anionowego siarczanu celulozy z kationowym chlorkiem polimetyloamonowym lub alginianu, siarczanu celulozy, chlorku wapnia polimetylenoguanidyny [35].

2.3.3. Nanopłaszczanie

Nanokapsułki to zwykle warstwy otaczające pojedynczą komórkę bakteryjną, a ich średnica nie przekracza 0,2 μ m [17]. Metoda ta eliminuje niewykorzystaną przestrzeń w rdzeniu kapsuły, co może korzystnie wpływać na transport cząsteczek między otoczeniem kapsułki a masą komórkową, jednocześnie zmniejszając rozmiary wszczepu. Sposobem wytwarzania takiego nośnika jest odwirowanie materiału komórkowego w gradiencie gęstości z polimerem np. z kopolimerem metakrylanu hydroksylowego i metakrylanu metylowego [70] lub z roztworem alginianu i czynnika sieciującego. Można także zastosować metodę warstwa po warstwie (LbL – *layer by layer*) wykorzystując elektrostatyczne oddziaływania poszczególnych warstw. W technice tej używa się głównie polielektrolitów, czyli polimerów z ugrupowaniami jonowymi lub ulegającymi jonizacji np. poli-L-lizyny wraz z polietylenoiminą bądź poli-L-lizyny wraz z sulfonaniem polistyrenu

sodu. Koacerwacja dwóch polielektrolitów dodatkowo naładowanej poli-L-lizyny i ujemnie naładowanej polietylenoiminy bądź sulfonianu polistyrenu prowadzi do powstania membrany koacerwacyjnej. Kilka prac wykazało, że zastosowanie tego typu związków jest przydatne w opłaszczaniu komórek eukariotycznych i drobnoustrojów (np. nanoopłaszczone drożdże zachowały swoją żywotność i zdolności wydzielnicze) [18]. Polietylenoimina może występować w formie liniowej bądź rozgałęzionej. Forma liniowa zawiera jedynie aminy drugorzędowe i w temperaturze pokojowej występuje w stałym stanie skupienia, dlatego do immobilizacji wykorzystywana jest forma rozgałęziona, która zawiera pierwszo, drugo i trzeciorzędowe grupy aminowe. Jednak jak pokazują badania, polietylenoimina może charakteryzować się wysoką toksycznością [76]. Sulfonian polistyrenu (sól sodowa sulfonianu polistyrenu, PSS) jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, a w medycynie wykorzystywany może być do zmniejszania stężenia jonów potasu we krwi. Doustne podawanie PSS może jednak wywołać utratę apetytu, wymioty, nudności, a nawet doprowadzić do martwicy jelita grubego [67].

3. Historia zastosowania nośników do immobilizacji materiału biologicznego

Naukowcy badają problem transplantacji nośników zawierających materiał biologiczny od początku XX wieku. W 1933 B i s c e g e l i e zamknęła komórki rakowe w polimerowej matrycy i wszczepiła je do jamy brzusznej świni [4]. Wyniki tego badania pokazały, że komórki nie zostały zniszczone przez system immunologiczny gospodarza. Około trzydzieści lat później, C h a n g wprowadził pomysł wykorzystywania tzw. „sztucznych komórek”, czyli układów, które naśladują funkcje biologiczne komórek własnych [9]. Idea ta została wdrożona w latach 70- i 80-tych XX wieku do immobilizacji komórek wysp trzustkowych wydzielających insulinę, jako ksenoprzeszczepu (przeszczepy ksenogeniczne to przeszczepy międzygatunkowe, allo-geniczne – wewnątrzgatunkowe) [11, 46]. Od tego czasu bardzo wiele wysiłku zostało włożone w lepsze zrozumienie tego typu układów. Trwają badania nad zastosowaniem enkapsulowanych komórek celem wspomagania chorej tkanki lub narządów. Taki układ może służyć do podawania leków, a także znaleźć zastosowanie biotechnologiczne np. przy produkcji różnego typu związków na skalę przemysłową. Z immobilizacją materiału biologicznego wewnątrz nośnika można spotkać się przy zastosowaniach w oczyszczaniu środowiska – biodegradacji [50], badaniach biogodności – badaniu cytotoxyczności [27], a także w inżynierii tkankowej w klonalnej selekcji pożądanych fenotypów [63].

4. Immobilizacja w zastosowaniach biomedycznych

4.1. Drogi podawania terapeutyków przy użyciu unieruchomionych komórek

Istnieją dwie podstawowe metody podawania terapeutyków w postaci enkapsulowanych komórek – wszczepienie lub terapia doustna. Wszczepienie polega na umieszczeniu urządzenia wydzielającego lek w określonym miejscu w organizmie. W zależności od ukrwienia tego miejsca, możemy osiągać wysokie stężenie czynnika terapeutycznego w osoczu, bądź jedynie w okolicach implantu. W terapii doustnej substancja może wchłaniać się w żołądku i jelicie, bądź tylko w jelicie. Preparaty wchłaniane z żołądka i jelit dostają się do układu krwionośnego, osiągając wysokie stężenie we krwi przez określony czas.

4.2. Właściwości kapsułek wykorzystywanych we wszczepieniach

Implantacja immobilizowanych komórek wiąże się z szeregiem trudności związanych ze strukturą, biogodnością, wytrzymałością i właściwościami chemicznymi. W celu rozwiązania możliwych problemów optymalizacja systemu dotyczy następujących sfer:

4.2.1. Struktura materiału nośnika

Interakcja między tkankami gospodarza a implantem zależy zarówno od struktury zewnętrznej jak i kształtu urządzenia. Wykazano, że implanty z ostrymi rogami wywołują silniejszą odpowiedź organizmu gospodarza (powstaje więcej komórek stanu zapalnego i wyższa jest aktywność enzymów komórkowych wokół implantu). Badania wykazały także różnice w zdolności do utrzymania przy życiu immobilizowanych komórek w implantach różniących się zewnętrzną strukturą [43]. Powierzchnia gładka stymuluje częściej reakcję fibrotyczną, podczas gdy powierzchnia szorstka indukuje wrastanie komórek gospodarza w struktury ściany. Uważa się, iż bioimplanty w postaci kapilar zapewniają bardziej powtarzalny kształt oraz wyższą gładkość powierzchni w porównaniu do mikrokapsułek [80].

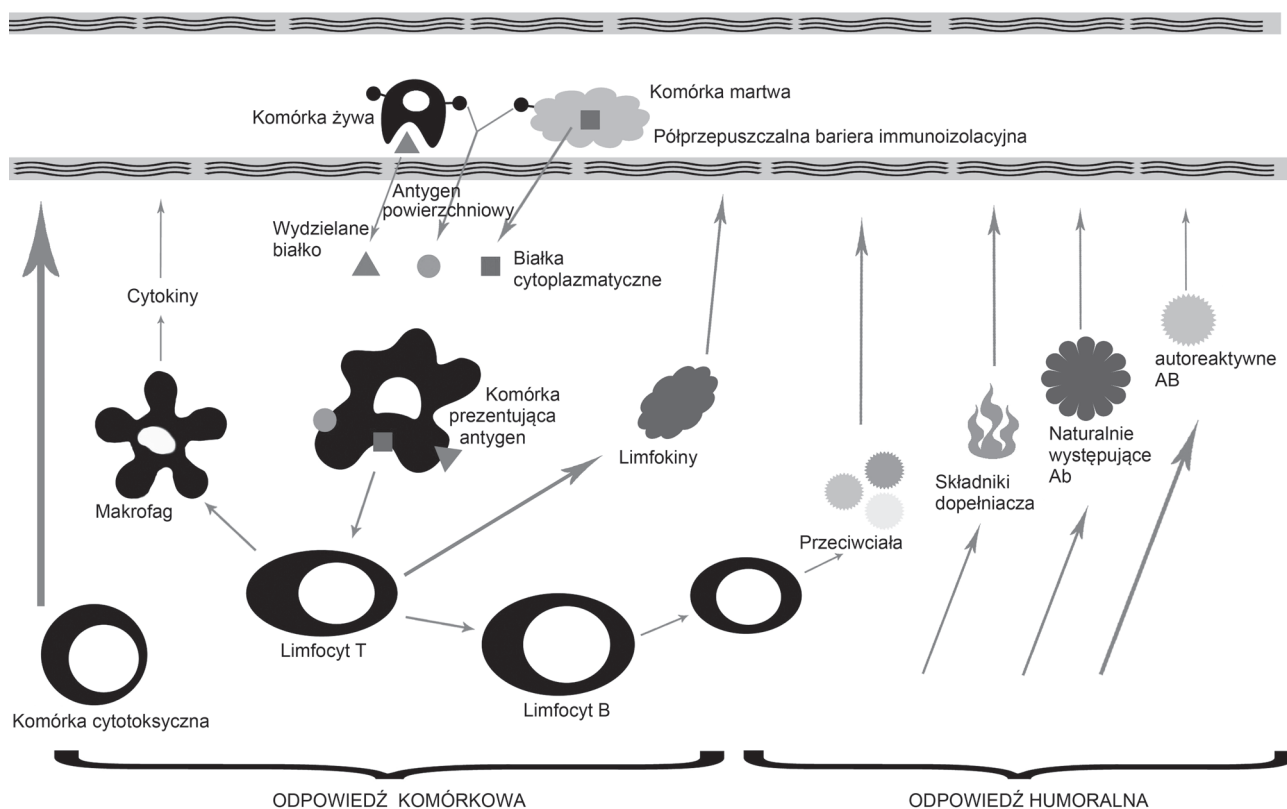
Struktura porów w nośniku determinuje zasięg interakcji między immobilizowanymi komórkami a środowiskiem zewnętrznym. Określana jest przez ich wielkość, rozmieszczenie oraz głębokość. Nośniki porowe, zgodnie z klasyfikacją IUPAC definiowane są jako mikroporowate (średnica porów niższa niż 2 nm), mezoporowate (średnica między 2 a 50 nm) i makroporowate (średnica powyżej 50 nm). Tylko niewielkie cząsteczki jak np. tlen mogą penetrować materiały mikroporowate. Materiały mezoporowate pozwalają na przepływ większych cząstek jak np. małych białek. Implanty zawierające makro-

pory pozwalają na przepływ dużych białek, czasem nawet całych komórek. Strukturę porów określa także Masa Cząsteczkowa Progu Odcięcia (MWCO – *Molecular Weight Cut Off*), czyli masa najmniejszej cząsteczki (wyrażona w kDa) która pozostaje w nośniku. Wiele z wykorzystywanych materiałów posiada jednak nieregularną strukturę i wielkość porów, a dodatkowo ich właściwości mogą ulegać zmianie w środowisku poimplantacyjnym (np. poprzez wchłanianie wody przez polimer bądź jego degradację). Pory powinny umożliwiać swobodny przepływ substancji odżywczych, tlenu i produktów przemiany, ale nie samych komórek. Transport substancji wzdłuż matrycy możliwy jest dzięki gradientowi stężeń. Badania wykazały, że głównym czynnikiem limitującym przeżywalność komórek w kapsułkach jest dostępność tlenu [69]. Komórki o większych wymaganiach pokarmowych powinny znajdować się w materiałach o bardzo dobrej przepuszczalności, komórki ksenogeniczne w przeciwieństwie do allogenicznych wymagają bardziej restrykcyjnej immunoizolacji [44].

Immunoizolacja to ochrona implantowanego materiału biologicznego przed reakcją immunologiczną gospodarza. Efektywność immunoizolacji związana jest bezpośrednio z wielkością porów w kapsule. Ważne jest, żeby aktywne składniki układu immunologicznego nie były w stanie oddziaływać z antygenami na powierzchni izolowanych komórek. Ponieważ kapsułki nie są barierami absolutnymi, a system immunologiczny zawiera cały szereg ścieżek obronnych, bardzo ciężko jest opra-

cować system, który zagwarantuje pełną ochronę immobilizowanego materiału biologicznego. Indukcja odpowiedzi może zacząć się wraz z dyfuzją przez matrycę antygenów powierzchniowych lub białek wydzielanych przez komórki żywe, a także białek uwolnionych z martwych komórek. Rozpoznawanie i prezentowanie antygenów przez komórki prezentujące antygen inicjuje komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną. Pierwszy z tych szlaków prowadzi do aktywacji między innymi komórek cytotoksycznych i makrofagów. Elementy te nie powinny przenikać do kapsulek, i jest to dość łatwo osiągalne dzięki regulacji wielkości porów. Znacznie trudniejsze jest hamowanie wnikania do nośnika składników odpowiedzi humoralnej. Należy dodatkowo pamiętać, że samo przeciwciało może nie wpływać niszcząco na obcą komórkę, np. patogennego drobnoustroju, ale może uruchomić dopełniacz, który tego dokona. Dla cytokin, limfokin i przeciwciał kapsuła okazuje się często niewystarczającą barierą. Ważnym problemem jest także wydzielanie przez makrofagi tlenu azotu, a także reaktywnych metabolitów tlenu [13]. Możliwe szlaki odpowiedzi immunologicznej względem immobilizowanych komórek wszczepionych do organizmu przedstawiono na Rysunku 1.

Kilku autorów w swych pracach wykazało, że wszczep może powodować niespecyficzną odpowiedź immunologiczną przeciwko implantowanym komórkom [5]. Dodatkowym problemem jest implantowanie komórek mających wydzielać fibrynogen, histaminę czy



Rys. 1. Oddziaływanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza z komórkami znajdującymi się w implancie

fibronektynę. Czynniki te powodują napływ granulocytów, bazofili i makrofagów w pierwszych dniach po implantacji. Makrofagi produkują czynniki takie jak TNF- α , TGF- β i histamina, stymulując komórki umieszczone w implancie [3].

4.2.2. Biozgodność

Biozgodność jest niezbędną cechą materiału warunkującą jego prawidłowe działanie w żywym organizmie. Nośnik w pełni biozgodny powoduje minimalną odpowiedź organizmu, do którego jest wszczepiany [75]. Materiał powinien być chroniony przed pokryciem przez fibroblasty (przerost tkanki włóknistej zaburza przepuszczalność matrycy) [20]. Nośnik nie może oddziaływać negatywnie na biorcę implantu, prowadzić do reakcji alergicznych lub toksycznych, wywoływać stanu zapalnego, zmian nowotworowych, być mutageny lub teratogeny. W kontakcie z krwią nie powinien wywoływać zmian w jej składzie, wpływać na krzepliwość krwi, a także zmieniać konfiguracji, morfologii i trwałości komórek immobilizowanych i komórek gospodarza.

4.2.3. Wytrzymałość

Materiał musi być tak wytrzymały, aby przetrwać proces implantacji w formie nienaruszonej. Już bardzo niewielkie uszkodzenia mogą powodować ucieczkę immobilizowanego materiału biologicznego. Dodatkowo nośnik musi charakteryzować się elastycznością i odpornością na rozciąganie. Wiele urządzeń immunoizolacyjnych zawiodło z powodu zbyt małej wytrzymałości mechanicznej – układy pękały uwalniając unieruchomione komórki do organizmu gospodarza.

4.2.4. Właściwości chemiczne

Nośnik powinien być nierozpuszczalny w środowisku, w którym drobnoustroje będą unieruchamiane. Ważna jest odporność na degradację chemiczną i mikrobiologiczną. Właściwości chemiczne determinują także możliwości sterylizacji i oczyszczania implantu. Dodatkowo obecność odpowiednich grup funkcyjnych może wpływać na przyleganie komórek lub białek do powierzchni nośnika. Pokrywanie matrycy przez białka może zatykać pory i znacząco obniżyć jej przepuszczalność.

Na przydatność materiału wpływa także jego cena, dostępność, możliwości regeneracji i zastosowania w skali przemysłowej, prostota i parametry biologiczne podczas unieruchamiania. Przykładowe materiały wykorzystywane do unieruchamiania dla zastosowań biomedycznych znajdują się w Tabeli I.

4.3. Właściwości kapsułek wykorzystywanych w terapii doustnej

Przewód pokarmowy jest doskonałym miejscem do dostarczania substancji terapeutycznych. Odpowiednio dobrane komórki mogą produkować enzymy, białka, przeciwciała czy leki. Tego typu układy mogą także zostać wykorzystane przy produkcji szczepionek jadalnych. Obecnie tylko nieliczne mogą być podawane doustnie, ponieważ często antygen zostaje uszkodzony podczas wędrówki przez układ trawienny, i nie może on indukować odpowiedniej reakcji ze strony układu immunologicznego. Immobilizowane komórki dostarczane do jelita i produkujące antygen mogą rozwiązać ten problem. Ze względu na nieprzyjazne środowisko do doustnej terapii komórek wykorzystuje się głównie

Materiały wykorzystywane do immobilizacji materiału biologicznego

Tabela I

	Zastosowany materiał	Komórki immobilizowane	Gospodarz	Piśmiennictwo
Makrokapsułkowanie	Polipropylen	Komórki trzustki chomika	Szczur	[36]
		Komórki wątroby płodowej świni	Szczur	[73]
		<i>Escherichia coli</i>	Mysz	[28]
	Poliuretan	Szczurze komórki trzustki	Szczur	[78]
		Komórki trzustki świni	Szczur	[82]
Poliaryloeterosulfon	Szczurze mioblasty	Mysz	[10]	
Polisulfon	Szczurze hepatocyty	Szczur	[80]	
Poliakrylonitryl	Szczurze komórki nowotworowe nadnerczy	Małpa	[1]	
Makrokapsułkowanie i pułapkowanie	Alginiano-L-lizyno-alginian	<i>Escherichia coli</i>	Szczur	[58]
	Silikon	Szczurze komórki trzustki	Szczur	[7]
	Alginian	Ludzkie hepatocyty	Badania <i>in vitro</i>	[16]
		Bakterie kwasu mlekowego		[68]
	Glikol polietylenowy	Komórki trzustki świni	Szczur	[15]
Amylopektyna	Szczurze komórki nadnerczy	Badania <i>in vitro</i>	[49]	

drobnooustroje. Bakterie wykorzystywane tu są jako małe bioreaktory. Dodatkowo charakterystyka wzrostu, krótki czas replikacji i wysoka odporność niektórych szczepów na warunki środowiska czyni je idealnymi kandydatami do produkcji substancji terapeutycznych w jelicie.

W terapii doustnej szerokie zastosowanie znajdują hydrożelowe kapsułki (np. których podstawę stanowi alginian, karagen, agaroz). Różnorodność wykorzystywanych nośników sprawia, że mogą być one odpowiednio dobierane, zależnie od tego jak zaplanujemy terapię. Po doustnym podaniu kapsułki narażone są na nieprzyjemne czynniki takie jak: aktywność różnego rodzaju enzymów, zachodzące w organizmie reakcje chemiczne, zmieniające się pH [24]. Ważne jest odpowiednio dobranie wielkości porów. Immunoizolacja nie musi być aż tak restrykcyjna jak w przypadku kapsułek implantowanych. Nośnik musi być biozgodny, ale nie musi być chroniony przed pokryciem przez fibroblasty. Dalej należy rozważyć czy immobilizowane komórki mogą być potencjalnie niebezpieczne dla człowieka. W przypadku pracy z genetycznie modyfikowanymi organizmami, kapsułki nie powinny rozpuszczać się w środowisku kwaśnym, ani po długiej ekspozycji na środowisko zasadowe. Gdy unieruchomione komórki mają dotrzeć do jelita (aby terapeutyk uwalniany był jedynie w jelicie, np. przez wzgląd na jego drażniące na żołądek działanie), należy upewnić się, że przetrwają nieuszkodzone przejście przez żołądek. Podczas dojelitowego dostarczania probiotyków przy użyciu kapsułek, wykorzystywany materiał powinien być nierozpuszczalny w środowisku kwaśnym, natomiast rozpuszczalny po odpowiedniej ekspozycji na środowisko zasadowe. Kapsułki warto dodatkowo powlekać substancjami wielkocząsteczkowymi, tak, aby ułatwić pobranie ich odpowiedniej ilości na raz, a jednocześnie stworzyć dodatkową barierę ochronną. Droga doustna podawania terapeutyków ma wiele zalet. Do pobrania nie jest wymagany żaden specjalistyczny sprzęt ani personel, a w razie przedawkowania lek w łatwy sposób można usunąć. Jest też relatywnie tania, a podawane kapsułki nie muszą być sterylne. By zaprojektować nośnik w terapii doustnej należy wziąć pod uwagę konieczność maksymalizowania przeżywalności bakterii i maksymalizowania zdolności do dostarczania substancji terapeutycznej.

4.4. Immobilizowany materiał biologiczny

Jako materiał biologiczny stosowany w immobilizacji nadają się odpowiednie szczepy bakterii bądź linie komórkowe, które wydzielają cząstki terapeutyczne przez długi okres czasu, bądź są w stanie pełnić określone funkcje przy ciągłej terapii doustnej. Można korzystać z linii pierwotnych, stabilnych, allogenicznych, ksenogenicznych. Przykładowe typy komórek

Tabela II

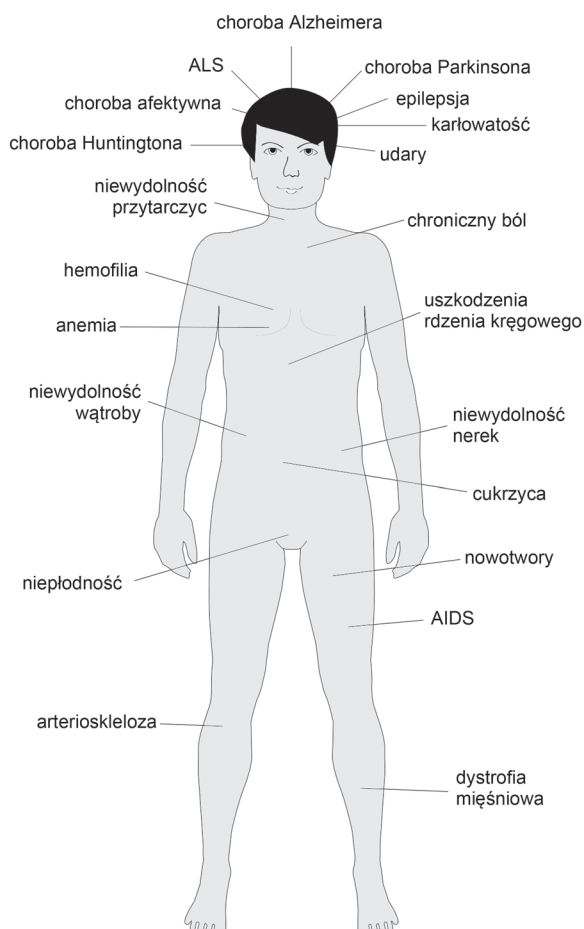
Przykładowe typy komórek wykorzystywanych do immobilizacji i ich zastosowania

Typ komórek	Zastosowanie	Piśmiennictwo
Mioblasty	Choroba Parkinsona Choroba afektywna Nowotwory Hemofilia	[1] [45] [12] [33]
Komórki macierzyste	Regeneracja kości	[22]
<i>Escherichia coli</i>	Usuwanie mocznika	[58]
Hepatocyty	Transplantacja wątroby	[31]
Komórki wysepek trzustkowych	Cukrzyca	[11]
Komórki przytarczyc	Sztuczne narządy	[32]
Komórki jajnika	Choroba Fabry'ego	[51]
<i>Oxalobacter formigenes</i>	Kamienie nerkowe	[21]
<i>Erwinia herbicola</i>	Fenyloketonuria	[47]

wraz z ich zastosowaniem zaprezentowano w Tabeli II. Przy wyborze odpowiedniego materiału biologicznego należy zwrócić uwagę na jego wymagania pokarmowe, odporność na stres oraz zmienność morfologiczną (ewentualne zmiany w rozmiarze komórek mogłyby umożliwiać im wydostawanie się z kapsuły). Ważne jest upewnienie się czy komórki, których używamy nie są zakażone wirusami, grzybami, a także zbadanie reakcji organizmu na inne poza pożądaną przez nas cząsteczką produkty wydzielane przez dany typ komórek. Bakterie posiadają przewagę nad eukariotycznymi liniami komórkowymi. Są zazwyczaj tańsze w hodowli, bardziej odporne na stres, mniej wymagające, jeśli chodzi o warunki zewnętrzne, mogą być aktywne przez dłuższy czas. Są także prostszymi modelami do modyfikacji. Genetycznie modyfikowane drobnooustroje, zaprojektowane w celu wydzielania pożądanego czynnika mogą stać się przyszłością terapii biohybrydowej. Przy pewnego typu terapiach niezastąpione mogą także okazać się bakteriofagi. Bardzo ważnym aspektem jest bezpieczeństwo biologiczne. W przypadku organizmów modyfikowanych genetycznie ekspresja genów powinna być regulowana wielopoziomowo, a same szczepy powinny być wysoce stabilne genetycznie.

4.5. Biomedyczne zastosowania immobilizowanych komórek

Znanych jest wiele chorób wywołanych niewystarczającym stężeniem odpowiednich cząstek w organizmie (Rys. 2), bądź ich nieprawidłowym metabolizmem. Terapia biohybrydowa umożliwia dostarczanie substancji terapeutycznych przez długi okres czasu. Implanty produkujące pożądaną cząstkę mogłyby wypełniać liczne defekty enzymatyczne. Drugim obszarem



Rys. 2. Wybrane choroby wywołane niedolnością organizmu do produkcji odpowiedniej ilości cząstek biologicznych

wykorzystującym unieruchomione komórki jest dostarczanie leków. Medycyna ciągle poszukuje skutecznej metody ukierunkowanego podawania terapeutyków. Implanty wszczepiane w pobliżu chorobowo zmienionego miejsca umożliwiałyby osiągnięcie lokalnie wysokich stężeń leków i jednocześnie zmniejszałyby wywołane przez nie skutki uboczne.

W terapiach biohybrydowych wykorzystywanych może być wiele typów związków: enzymy, inhibitory, aktywatory, przeciwciała. Uwalnianie cząstek terapeutycznych może być konstytutywne bądź stymulowane. Uwalnianie konstytutywne jest najprostszym systemem i umożliwia otrzymanie stałych porcji substancji z kapsuły do zewnętrznej tkanki. Uwalnianie kontrolowane umożliwia odpowiedź komórek znajdujących się wewnątrz kapsulek na pewne sygnały z wnętrza organizmu (produkcja cząstek tylko wtedy, kiedy organizm tego wymaga), może też być indukowane podaniem pacjentowi odpowiedniej substancji. Dodatkową kontrolę uwalniania mogą stanowić mechanizmy dyfuzji. Jeżeli stężenie cząstek terapeutycznych na zewnątrz kapsułki będzie wysokie, produkty te nie będą dalej dyfundowały na zewnątrz matrycy. Zaletą terapii biohybrydowych jest to, że immobilizowane, genetycznie

modyfikowane komórki mogą wytwarzać każdą pożądaną cząstkę *in vivo* bez modyfikacji genomu gospodarza. Układy te pozwalają także na zmniejszenie lub całkowite wycofanie podawania leków immunosupresyjnych. Immobilizacja komórek ma wiele zalet w porównaniu z immobilizacją białek, ponieważ pozwala na długotrwałe i kontrolowane dostarczanie cząsteczek produkowanych *de novo*. Poza tym, jeżeli implant ulegnie uszkodzeniu, toksyczność spowodowana wysokim stężeniem leku będzie znacznie mniejsza. Problemem jest ewentualne uwolnienie komórek z kapsulek i wywołanie reakcji immunologicznej.

Enkapsulacja może być także wykorzystywane przy dojelitowym dostarczaniu terapeutyków, a enkapsulowane bakteriofagi, mogą usuwać patogeny jelitowe takie jak *Salmonella* czy *Clostridium* [23, 38].

4.5.1. Wykorzystanie unieruchomionych komórek eukariotycznych

Przeprowadzono badania dotyczące leczenia metachromatycznej leukodystrofii przy użyciu membran immobilizacyjnych [14]. Ta neurodegeneracyjna choroba wywołana jest niskim poziomem arylosulfatazy A w organizmie. Zmodyfikowana genetycznie linia komórkowa mysich mioblastów C2C12 stała się zdolna do produkcji artylosulfatazy A. Komórki zamykano w kapilarach z poliaryloeterosulfonu. Wykazano, że badana linia produkuje pożądaną enzym, jednocześnie przeżywając nawet 4 tygodnie po implantacji do allogenicznej myszy.

Inny eksperyment dotyczył leczenia cukrzycy za pomocą kapsułkowanych komórek [44]. Nośniki wykonane zostały z polimeru akrylowego i posłużyły do transplantacji szczurzych wysepek trzustkowych myszom chorym na tę chorobę. Matryca okazała się biokompatybilna, implant nie był odrzucany i umożliwiał utrzymanie poziomu cukru we krwi w normie nawet przez 60 dni.

Stworzono także system umożliwiający kontrolowane wydzielanie erytropoetyny przez immobilizowany materiał biologiczny [71]. Zmodyfikowane fibroblasty wydzielały hormon peptydowy w obecności doksycykliny bądź mifepristonu. Kapilary implantowane były do jamy otrzewnej myszy. U zwierząt, którym podawano doksycyklinę lub mifepriston obserwowano podwyższone stężenie erytropoetyny w surowicy podczas 6-miesięcznej obserwacji (podwyższonego poziomu nie obserwowano u myszy nieotrzymujących antybiotyków).

Wykorzystano także genetycznie zmodyfikowane mioblasty do produkcji VEGF i FGF-2 (czynniki angiogenezy) [66]. Komórki zamykano w polimerowych nośnikach z polieterosulfonu i implantowano szczurom. Tylko komórki produkujące FGF-2 okazały się skutecznie redukować nekrozę tkanki. Terapia ta może być wykorzystywana przy chorobach niedokrwiniennych.

Systemy oparte na komórkach modyfikowanych genetycznie zamkniętych w kapilarach mogą także dostarczać czynniki neurotropowe [45]. Produkcja tego typu cząstek mogłaby skutecznie leczyć choroby neurodegeneracyjne. Odpowiednio zmodyfikowana genetycznie linia komórkowa C2C12 efektywnie wydzielala rzęskowy czynnik neurotropowy. Wykazano także, że żywotność komórek a także efektywność produkcji czynnika może zależeć od wykorzystanej do kapsułkowania matrycy.

Inne badania wskazały na obiecujące wyniki w zakresie leczenia kapsułkowanymi komórkami choroby Parkinsona [81]. Układy tego typu mogą także znaleźć zastosowanie w leczeniu raka. Obiecujące wyniki w tej sferze dały badania z dostarczaniem do nowotworowo zmienionych miejsc czynników takich jak cytochrom P-450 i IL-2 a także inhibitorów angiogenezy [12, 39, 65]. Trwają badania nad leczeniem tą metodą stwardnienia zanikowego bocznego [83].

Pojawiają się pojedyncze doniesienia o zastosowaniu terapii immobilizowanymi komórkami u pacjentów. Gu n z b u r g i wsp. przeprowadzili terapię nowotworu trzustki, polegającą na wszczepieniu w miejscu nowotworu, enkapsulowanych komórek L293 modyfikowanych genetycznie do produkcji enzymu aktywującego czynnik przeciwnowotworowy podawany pacjentom. Stwierdzono u 10 pacjentów zatrzymanie wzrostu nowotworu w ciągu 20-tygodniowej obserwacji [30]. Jednak unieruchamianie materiału biologicznego nie jest dotąd stosowane w klinicznej praktyce, głównie z powodu ograniczonej żywotności wszczepów [29].

Jak widać, cały czas prowadzone są prace nad zastosowaniem immobilizowanego materiału komórkowego dla celów terapeutycznych, uwieńczone pojedynczymi zastosowaniami klinicznymi, pomimo konkurencyjnych dla tych metod badań prowadzonych nad możliwością generowania zastępczych narządów z własnych komórek macierzystych pacjentów.

4.5.2. Wykorzystanie unieruchomionych drobnoustrojów

Graniczka i wsp., przeprowadzili badania dotyczące uwalniania zielonego białka fluoryzującego (GFP – *green fluorescent protein*) przez makrokapsułkowane w polipropylenowych membranach kapilarnych komórki *E. coli*. Wydzielane białko miało posłużyć jako model substancji terapeutycznej. Membrany kapilarne implantowano myszom. Wykazano, że użyta matryca jest szczelna względem immobilizowanego szczepu, a produkowane GFP jest w stanie przekraczać barierę, jaką jest membrana [28]. Naturalnie, w literaturze nie brak przykładów bardziej bezpośrednio demonstrujących przydatność immobilizowanych drobnoustrojów *in vivo*.

Zbadano możliwość usuwania mocznika przez doustne podawanie mikrokapsulek zawierających genetycznie zmodyfikowaną *E. coli* (plazmid pAKU17 zawierający geny ureazy *ureaDABCEFG* z *Klebsiella aerogenes* został wtransformowany do *E. coli* DH5) [60]. Doustna dawka kapsulek APA zawierających zmodyfikowany szczep skutkowała spadkiem wysokiego poziomu mocznika u szczurów chorych na mocnicę. Metoda ta okazała się skuteczna podczas 21 dniowej terapii. Szczury leczone przeżywały okres eksperymentalny, jednocześnie 50% nieleczonych szczurów w tym czasie umierało [58].

W badaniach *in vitro* zmodyfikowaną *E. coli* DH5 zamknięto w kapsułkach zbudowanych z poli(alkoholu winylowego) (PVA – *polyvinyl alcohol*). PVA charakteryzuje się znacznie wyższą wytrzymałością mechaniczną niż APA. W ten sposób rozwiązany może zostać wcześniej napotkany problem łamliwości kapsulek zbudowanych z APA. Badania *in vitro* wykazały, że 100 mg kapsułkowanej hodowli bakteryjnej może usunąć 18,4 mg mocznika w 4 godziny [24].

Prakash i Chong zbadali rozkład innych niż mocznik metabolitów przy użyciu mikrokapsulek zawierających zmodyfikowane komórki *E. coli* DH5 (badania *in vitro*) [59]. Zaobserwowano spadek w osoczu stężenia potasu, magnezu, fosforu, sodu, chloru, cholesterolu, bilirubiny, kreatyniny i kwasu moczowego, co może mieć ogromne znaczenie terapeutyczne między innymi przy niewydolności nerek. W eksperymentach tych bakterie zamykane były w kapsułkach APA. Wykazano, że kapsułki te nie wpływają w sposób zauważalny na metabolizm immobilizowanych komórek *E. coli*. Profil białkowy komórek kapsułkowanych w APA nie różnił się znacząco od profilu białkowego komórek będących w stanie wolnym [57].

Garofalo i Chong w swoich badaniach wykazali, że *Pseudomonas pictorum* jest w stanie usuwać nadmiar cholesterolu z surowicy. Drobnoustrój ten immobilizowany był w kapsułkach alginianowych, polilizynowo-alginianowych, a także kapsułkach agarowych. Tylko w przypadku kapsulek agarowych zaobserwowano spadek poziomu cholesterolu porównywalny z tym, który uzyskiwano dla komórek w stanie wolnym. Jednocześnie, nie obserwowano wydostawania się komórek z nośnika. Pory w mikrokapsułkach alginianowych i alginianowo-polilizynowych były zbyt małe, i stanowiły barierę dla przepływu lipoprotein [26]. Dalsze badania z użyciem matryc agarowych wykazały, że znacznie skuteczniejsze w usuwaniu cholesterolu są mikrokapsułki o średnicy 0,5 mm – 1,6 mm niż te o średnicy powyżej 2,5 mm [25].

Borkowska i wsp. zastosowali enkapsulowane w modyfikowanych powłokach polilizynowo-polietylenoiminowych bakterie *B. subtilis*, szczepy zrekombinowane wydzielające toksyny, wykazując cytotoksyczny wpływ na komórki białaczkowe pacjentów z ostrą białaczką limfatyczną [8].

Lloyd-George i Chang umieścili w kapsułkach komórki *Erwinia herbicola* wykazujące aktywność fenolo-liazy tyrozynowej (TPL – tyrosine phenol-lyase). Podczas trwania eksperymentu badano reakcję enzymatyczną amoniaku i pirogronianiu wraz z fenolem czy katecholem odpowiednio w L-tyrozinę bądź L-3,4-dihydroksyfenyloalaninę (badania *in vitro*). Wykorzystany szczep kapsułkowany był w matrycy APA. Nie wykazano różnic w aktywności TPL między szczepem kapsułkowanym a szczepem w stanie wolnym. Aktywność TPL mikrokapsułkowanych komórek *E. herbicola* mogłaby znaleźć zastosowanie w usuwaniu amoniaku czy fenolu przy niewydolności wątroby [47].

Doustne dostarczanie kapsułkowanych bakterii może także stać się skuteczną metodą w leczeniu kamieni nerkowych. *Oxalobacter formigenes* produkuje enzymy degradujące szczawiany, niszcząc ich nadmiar, główny czynnik ryzyka powstawania i wzrostu kamieni nerkowych u pacjentów z kamicą nerkową [21].

Terapia oparta na kapsułkowanych drobnoustrojach wpływających na stężenia aminokwasów w osoczu mogłaby okazać się skuteczna np. przy leczeniu fenylketonurii [47]. Bakterie mogłyby także wpływać na poziom wodoru i azotu cząsteczkowego we krwi. Żywe komórki dostarczane doustnie metabolizujące wodór czy azot do związków takich jak metan czy woda zapobiegałyby chorobie dekompresyjnej bądź zmniejszały czas dekompresji. Bakterie mające potencjalne zastosowanie w tej terapii to metabolizujący wodór *Methanobrevibacter smithii* czy azot – bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [42].

Mikrokapsułkowane drobnoustroje mogłyby także radzić sobie z chorobami jelita związanymi z podniesionym poziomem kwasów żółciowych. *Lactobacillus reuterii* jest zdolny do wiązania kwasów żółciowych i mógłby łagodzić problem związany z nadmiernym wydzielaniem elektrolitów, towarzyszącej mu bieguncie i odwodnieniu [40].

Poza kapsułkowaniem szczepów zdolnych do wydzielania substancji mogących wypełniać defekty enzymatyczne czy cząstek, których organizm produkować nie może, kolejnym zastosowaniem jest kapsułkowanie probiotyków. Żywe komórki, jako uzupełnienie diety pozytywnie mogą wpłynąć na bakteryjną florę jelitową. Analizy jedzenia wzbogacanego w probiotyki oraz niektórych preparatów farmaceutycznych wykazały, że podawane w ten sposób szczepy mają niską przeżywalność i zdolność do zasiedlania jelita [48]. Bakterie muszą przejść takie biologiczne bariery jak kwaśne środowisko żołądka, czy żółć w jelicie. Jak wykazano, probiotyki obniżają poziom cholesterolu, wzmagają tolerancję laktozy, a także mogą zapobiegać nowotworom, biegunkom i modulują aktywność układu odpornościowego. Enkapsulacja bakterii w alginianie wapnia jest często używana do immobilizacji szczepów ze względu na nietoksyczność nośnika, łatwość metody oraz jej niski koszt.

Wykazano, że immobilizowane w ten sposób bakterie przeżywają w warunkach zbliżonych do tych, panujących w żołądku i jelicie, a także zachowują w nich swoją aktywność (badania *in vitro*). Matryca hydrożelowa jest rozpuszczalna w 37°C, w zasadowym pH (warunki panujące w jelicie cienkim), uwalniając bakterie do środowiska. Metoda ta, może być bardzo efektywna przy dostarczaniu różnego rodzaju probiotyków takich jak *Lactobacillus* czy *Bifidobacterium*, a także wykorzystywana do dostarczania różnego rodzaju związków aktywnych do jelita [23].

Enkapsulacja materiału biologicznego może także zostać wykorzystana w terapii fagowej. Bakteriofag Felix O1 okazał się bardzo skutecznym w walce z zakażeniami *Salmonella* [79]. Jednak, aby fag podawany doustnie okazał się skutecznym w leczeniu patogenów jelitowych, musi przetrwać nieprzyjemne warunki panujące w układzie pokarmowym zwierząt czy człowieka (a bez ochrony nie jest w stanie tego zrobić) [38]. Niezbędne więc okazuje się jego kapsułkowanie. Badania wykazały, że Felix O1 immobilizowany w mikrokapsułkach chitozowo-alginianowych jest odzyskiwany przy długotrwałej ekspozycji na stymulowane warunki układu pokarmowego (liczba cząstek fagowych po godzinnej ekspozycji na pH 2,4 spadła o 2,58 jednostki logarytmiczne (fag w stanie wolnym nie był wykrywalny już po 5 minutach ekspozycji na pH poniżej 3,7)). Kapsułki rozpuszczały się po 6 godzinach w pH 6,8.

Podobne badania przeprowadził Stanford i wsp. Autorzy wykorzystali cztery fagi: wV8, rV5, wV7 i wV11 (bakteriofagi *E. coli* O157:H7 – enterohemolityczny szczep wywołujący choroby układu pokarmowego i moczowego) zamknięte w polimerowych kapsułkach. Po 20 minutowej ekspozycji na pH 3,0 odzyskiwano 13,6% cząstek fagowych (po uwolnieniu w pH 7,2). Dla porównania, w tych warunkach fagi niekapsułkowane całkowicie traciły swoją aktywność [72].

5. Podsumowanie

Pierwsze badania z wykorzystaniem enkapsulowanych komórek eukariotycznych pochodzą z lat 30-tych XX wieku. Od tego czasu wprowadzono wiele technik immobilizacji, a najprostszy podział wyróżnia pułapkowanie, kapsułkowanie i nanoopłaszczanie. Bardzo ważne jest odpowiednie dobranie materiału, z którego kapsułki będą wykonane, a optymalizacja systemu dotyczy struktury, biodegradacji, wytrzymałości i właściwości chemicznych. Unieruchomione, immunoizolowane komórki, wydzielające czynniki terapeutyczne, wszczepione do organizmu, pozwalają na regulację lub modyfikację procesów biologicznych, a tym samym leczenie różnych zaburzeń. Nośniki stosowane są z powodzeniem do immunoizolacji komórek eukariotycznych, jednak kapsułkowanie drobnoustrojów do zastosowań

biomedycznych budzi ciągle wątpliwości przez wzgląd na bezpieczeństwo.

W przyszłości unieruchamianie materiału biologicznego prawdopodobnie zajmie ważne miejsce w medycynie. Wiele aspektów tej metody wymaga jeszcze opracowania. Przedmiotem badań są w dalszym ciągu: zastosowanie allogenicznych i ksenogenicznych komórek, ich przeżywalność, immunoprotekcja, biokompatybilność nośników, długoterminowa skuteczność układów, ściśle kontrolowane wydzielanie cząstek terapeutycznych, kontrola proliferacji (przepełnienie kapsulek komórkami może obniżyć żywotność immobilizowanych komórek) i wytrzymałość układów. Gdy już powyższe kwestie zostaną dokładnie zbadane, można będzie oczekiwać bardziej powszechnych zastosowań klinicznych układów z immobilizowanym materiałem biologicznym.

* * *

Badania nad immobilizacją i jej zastosowaniami biomedycznymi prowadzone przez autorów były dofinansowane przez MNiSW grant nr: N N401 015936 oraz NCN grant nr N N401 592840.

Pracę dedykujemy pamięci Jarosława Wiśniewskiego, który zapoczątkował badania nad immobilizacją w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW.

Piśmiennictwo

- Aebischer P., Goddard M., Signore A., Timpson R.: Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Experiment. Neurol.* **126**, 151–158 (1994)
- Arshady R.: Microcapsules for foods. *J. Microencapsul.* **10**, 413–435 (1993)
- Babensee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L.V., Mikos, A.G.: Host response to tissue engineered device. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **33**, 111–139 (1998)
- Bisceglie V.: Über die antineoplastische immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-embryonen. *Zeit. Krebsforsch.* **40**, 122–140 (1933)
- Blasi P., Giovagnoli S., Schoubeen A., Ricci M., Rossi C., Luca G., Basta G., Calafiore R.: Preparation and in vitro and in vivo characterization of composite microcapsules for cell encapsulation. *Int. J. Pharm.* **324**, 27–36 (2006)
- Bonin S.: Mikroorganizmy immobilizowane. *Agro Przemysł*, **6**, 20–23 (2008)
- Boninsegna S., Bosetti P., Carturan G., Dellagiocoma G., Dal-Monte R., Rossi M.: Encapsulation of individual pancreatic islets by sol-gel SiO₂: a novel procedure for perspective cellular grafts. *J. Biotechnol.* **100**, 277–286 (2003)
- Borkowska M., Łyżniak M., Grzeczkwicz A., Stachowiak R., Kawiak J., Bielecki J., Budziszewska B., Granicka L.: The Cytotoxic effect of polyelectrolyte shells coated bacterial cells on human leukemia cells. *Nanomed. Nanotech.* (2012), <http://www.omicsonline.org/2157-7439/2157-7439-3-152.pdf>
- Chang T.M.S.: Semipermeable microcapsules. *Science*, **146**, 524–525 (1964)
- Cheung S., Tai J., Tze W.: Effect of molecular weight of polysulfone fibres on macroencapsulated pig islet xenograft function in diabetic mice. *Cell Transplant.* **29**, 2144–2145 (1997)
- Chick W.L.: Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science*, **187**, 847–848 (1975)
- Citrone P., Bourgeois M., Chang P.L.: Antiangiogenic cancer therapy with microencapsulated cells. *Hum. Gene Ther.* **14**, 1065–1077 (2003)
- Colton C.K.: Engineering challenges in cell encapsulation technology. *Trends Biotechnol.* **14**, 158–162 (1996)
- Consiglio A., Bordignon C. i wsp.: Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J. Neurol. Sci.* **255**, 7–16 (2007)
- Cruise G.M., Hegre O.D., Lamberti F.V., Hager S.R., Hill R., Scharp D.S., Hubbell J.A.: In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant.* **8**, 293–306 (1999)
- David B., Dufresne M., Nagel M.D., Legallais C.: In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidized bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1204–1212 (2004)
- Dembczyński R., Jankowski T.: Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **41**, 5–17 (2004)
- Diaspro A., Silvano D., Cavalleri O., Gliozzi A.: Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir*. **18**, 5047–5050 (2002)
- Ding W.K., Shah N.P.: An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J. Food Sci.* **74**, 53–61 (2009)
- Dulong J.L., Legallais C.: Contribution of a finite element model for the geometric optimization of an implantable bioartificial pancreas. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 183–192 (2000)
- Duncan S.H., Richardson A.J., Kaul P., Holmes R.P., Allison M.J., Stewart C.S.: *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3841–3847 (2002)
- Endres, M., Wenda N., Woehlecke H., Neumann K., Ringe J., Erggelet C., Lerche D., Kaps C.: Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection. *Acta Biomater.* **6**, 436–444 (2010)
- Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.: Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J. Microencapsul.* **19**, 485–494 (2002)
- Gao H., Yu Y., Cai B., Wang M.: Preparation and properties of microencapsulated genetically engineered bacteria cells for oral therapy of uremia. *Chin. Sci. Bull.* **49**, 1117–1121 (2004)
- Garofalo F.A., Chang T.M.: Effects of mass transfer and reaction kinetics on serum cholesterol depletion rates of free and immobilized *Pseudomonas pictorum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27**, 75–91 (1990)
- Garofalo F.A., Chang T.M.: Immobilization of *P. pictorum* in open pore agar, alginate and polylysine-alginate microcapsules for serum cholesterol depletion. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs*, **17**, 271–89 (1989)
- Goguen B., Kedersha N.: Clonogenic cytotoxicity testing by microdrop encapsulation. *Nature*, **363**, 189–190 (1993)
- Granicka L.H., Żoźnierowicz J., Wasilewska D., Weryński A., Kawiak J.: Induced Death of *Escherichia coli* encapsulated in a hollow fiber membrane as observed in vitro or after subcutaneous implantation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 224–228 (2010)

29. Groot M., T.A. Schuur, R. van Schilfhaarde: Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J. Surg. Res.* **121**, 141–150, (2004)
30. Gunzburg W.H., Salmons B: Use of cell therapy as a means of targeting chemotherapy to inoperable pancreatic cancer. *Acta Biochim. Polon.* **52**, 601–607 (2005)
31. Hai-Ying G., Zhong C., Rong-Xiao S., Su-Su Y., Hong-Yuan C., Yi-Tao D., Ai-Min Y.: The immobilization of hepatocytes on 24 nm-sized gold colloid for enhanced hepatocytes proliferation. *Biomaterials*, **25**, 3445–3451 (2004)
32. Hasse, C., Klöck G., Schlosser A., Zimmermann U., Rothmund M.: Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet*, **350**, 1296–1297 (1997)
33. Hortelano G., AI-Hendy A., Frederick A., Chang P.L.: Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. *Blood*, **87**, 5095–5103 (1996)
34. Hunkeler D., Prokop A., Powers A., Haralson M., Di Mari S., Wang T.A.: Screening of polymers as biomaterials for cell encapsulation. *Polymers News*, **22**, 232–240 (1997)
35. Hunkeler D.: Polymers for bioartificial organs. *Trends Polymers Sci.* **5**, 286–293 (1997)
36. Imai M., Kawabata N., Kato K., Kawahara T., Nakazawa F., Sawa M., Kasai S., Mito M.: Successful xenograft in streptozotocin induced diabetic rat using dispersed hamster islet tissue within microporous polypropylene bag. *Cell Transplant.* **5**, 51–65 (1996)
37. Jasiński A., Słomski R., Szalata M., Lipiński D.: Transplantacja narządów – wyzwanie dla biotechnologii. *Biotechnologia*, **72**, 7–28 (2006)
38. Joerger R.D.: Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* **82**, 640–647 (2003)
39. Joki T., Machluf M., Atala A., Zhu J., Seyfried N.T., Dunn I.F., Abe T., Carroll R.S., Black P.: Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat. Biotech.* **19**, 35–39 (2001)
40. Jones M.L., Chen H., Ouyang W., Metz T., Prakash S.: Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *J. Biomed. Biotechnol.* **27**, 61–69 (2004)
41. Karger-Kocsis J.: Polypropylene, structure and morphology, str. 1–30, Chapman and Hall, Londyn 1995
42. Kayar S.R., Axley M.J.: Accelerated gas removal from divers tissues utilizing gas metabolizing bacteria. US Patent 5 922 317 (1997)
43. Lacy P.E., Hegre O.D., Gerasimidi-Vazeou A., Gentile F.T., Dionne K.E.: Maintenance of normoglycemia in diabetic Lysaght mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science*, **254**, 1782–1784 (1991)
44. Lanza R.P., Jackson R., Sullivan A., Ringeling J., McGrath C., Kuhlreiber W., Chick W.L.: Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplant.* **67**, 1105–1111 (1999)
45. Li R.H., Williams S., Burkstrand M., Roos E.: Encapsulation matrices for neutrophilic factor-secreting myoblast cells. *Tissue Eng.* **6**, 151–163 (2000)
46. Lim F., Sun A.M.: Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, **210**, 908–909 (1980)
47. Lloyd-George I., Chang T.M.: Free and microencapsulated *Erwinia herbicola* for the production of tyrosine. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.* **21**, 323–333 (1993)
48. Matsuzaki T., Chin J.: Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 67–73 (2000)
49. Mercier P., Fernandez F., Tortosa F., Bagheri H., Duplan H., Tafani M., Bes J.C., Bastide R., Lazorthes Y., Sallerin B.: A new method for encapsulation of living cells: preliminary results with PC12 cell line. *J. Microencaps.* **18**, 323–334 (2001)
50. Moslemy P., Neufeld R.J., Guiot S.R.: Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. *Biotech. Bioeng.* **80**, 175–184 (2002)
51. Naganawa Y., Ohsugi K., Kase R., Date I., Sakuraba H., Sakuragawa N.: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplant.* **11**, 325–9 (2002)
52. O'Shea G. M., Goosen M.F.A., Sun A.M.: Prolonged survival of transplanted islets of langerhans encapsulated in a bio-compatible membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **804**, 133–135 (1984)
53. Orive G., Hernandez R.M., Gascon A., Pedraz J.L.: Biomedical application of immobilized cells. *Methods Biotech.* **22**, 427–437 (2006)
54. Ouyang W., Chen H., Jones M.L., T. Haque, Martoni C., Afkhami F., Prakash S.: Novel multi-layer APPA microcapsules for oral delivery: preparation condition, stability and permeability. *Indian J. Biochem Biophys.* **46**, 491–497 (2009)
55. Posillico E. G.: Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Biotechnol.* **4**, 114–117 (1986)
56. Pothakamury U.R., Barbosa-Cánovas G.V.: Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci. Tech.* **6**, 397–406 (1995)
57. Prakash S., Chang T.M.S.: Growth kinetics of genetically engineered *E. coli* DH 5 cells in artificial cell APA membrane microcapsules: preliminary report. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **27**, 291–301 (1999)
58. Prakash S., Chang T.M.S.: Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nat. Med.* **2**, 883–887 (1996)
59. Prakash S., Chang, T.M.S.: Artificial cell microcapsules containing genetically engineered *E. coli* DH5 cells for in-vitro lowering of plasma potassium, phosphate, magnesium, sodium, chloride, uric acid, cholesterol, and creatinine: a preliminary report. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **27**, 475–481 (1999)
60. Prakash S., Chang, T.M.S.: Preparation and in-vitro analysis of genetically engineered *E. coli* DH5 cells, microencapsulated in artificial cells for urea and ammonia removal. *Biotech. Bioeng.* **46**, 621–626 (1995)
61. Prakash S., Jones M.L.: Artificial Cell Therapy: New Strategies for the Therapeutic Delivery of Live Bacteria. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**, 44–56 (2005)
62. Prakash S., Urbanska A.M.: Colon-targeted delivery of live bacterial cell biotherapeutics including microencapsulated live bacterial cells. *Biologics Targ. Ther.* **2**, 355–378 (2008)
63. Pueyo M.E., Darquy S., Arbet-Engels C., Poitout V., Di Maria S., Gangnerau M.N., Reach G.: A method for obtaining mono-dispersed cells from isolated porcine islets of Langerhans. *Int. J. Artif. Org.* **18**, 34–38 (1995)
64. Rabanel J.M., Banquy X., Zouaoui H., Mokhtar M.: Progress Technology in Microencapsulation Methods for Cell Therapy. *Biotechnol. Prog.* **25**, 946–963 (2009)
65. Read T.A., Sorensen D.R., Mahesparan R., Enger P.R., Timpl R., Olsen B.R., Hjelstuen H.B., Haraldseth O., Bjerkvig R.: Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat. Biotech.* **19**, 29–34 (2001)
66. Rinsch, C., Quinodoz P., Pittet B., Alizadeh N., Baetens D., Montandon D., Aebischer P., Pepper M.S.: Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther.* **8**, 523–533 (2001)

67. Rogers F.B., Li S.C.: Acute colonic necrosis associated with sodium polystyrene sulfonate (Kayexalate) enemas in a critically ill patient: case report and review of the literature. *J. Trauma*. **51**, 395–397 (2001)
68. Ross G.R., Gullis C., Gonzalez N.S.: Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 2121–2125 (2008)
69. Schrezenmeir, J., Kirchgessner J.: Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islet organs. *Transplant.* **57**, 1308–1314 (1994)
70. Sefton M.V., May M.H., Lahooti S., Babensee J.E.: Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance. *J. Contr. Release*, **65**, 173–186. (2000)
71. Serguera C., Bohl, D., Rolland E., Prevost P., Heard J.M.: Control of erythropoietin secretion by doxycycline of mifepristone in mice bearing polymer encapsulated engineered cells. *Hum. Gene Ther.* **10**, 375–383 (1999)
72. Stanford K., McAllister M.A., Niu Y.D., Stephens T.P., Mazzocco A, Waddell T.E., Johnson R.P.: Oral Delivery Systems for Encapsulated Bacteriophages Targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *J. Food Prot.* **73**, 1304–12 (2010)
73. Takebe K., Shimura T., Munkhbat B., Hagihara M., Nakaniishi H., Tsuji K.: Xenogeneic (pig to rat) fetal liver fragment transplantation using macrocapsules for immunosolation. *Cell Transplant.* **5**, 31–33 (1996)
74. Tuszyński T. Immobilizacja droboustrojów. Możliwości ich przemysłowego wykorzystania. *Laboratorium*, **10**, 34–39 (2008)
75. Uludag H., de Vos P., Tresco P.A.: Technology of mammalian cell encapsulation, *Adv. Drug Deliv.* **42**, 29–64 (2000)
76. Vancha A.R., Govindaraju S., Parsa K., Jasti M., González-García M., Ballester R.: Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnol.* **4**, 23 (2004)
77. Wang T.G., Cell encapsulation technology and therapeutics (w) Birkhäuser, red. W. M. Kühntreiber, R.P. Lanza, W.L. Chick., Boston, 1999, s. 29–30.
78. Ward R.S., White K.A., Wolcott C.A., Wang A.Y., Kuhn R.W., Taylor J.E., John J.K.: Development of a hybrid artificial pancreas with a dense polyurethane membrane. *ASAIO J.* **39**, 261–267 (1993)
79. Whichard J.M., Sriranganathan N., Pierson F.W.: Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J. Food Prot.* **66**, 220–225 (2003)
80. Yang M.B., Vacanti J.P., Ingber D.E.: Hollow fibers for hepatocyte encapsulation and transplantation: studies of survival and function in rats. *Cell Transplant.* **3**, 373–385 (1994)
81. Yasuhara T., Date I.: Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application. *Cell Transplant.* **16**, 125–132 (2007)
82. Zondervan G.J., Hoppen H.J., Pennings A.J., Fritschy W., Wolters G.: Design of a polyurethane membrane for the encapsulation of islets of Langerhans. *Biomaterials*, **13**, 136–144 (1992)
83. Zurn A.D., Henry H., Schelup M., Aubert V., Winkel L., Eilers B., Bauchmann C., Aebischer P.: Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogenic cells. *Cell Transplant.* **9**, 471–484 (2000)

CHOROBA NIEDOKRWIENNA SERCA A ZAKAŻENIA BAKTERYJNE *HELICOBACTER PYLORI* I *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* – ROLA BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO I ZJAWISKO MIMIKRY ANTYGENOWEJ

Agnieszka Matusiak^{1*}, Magdalena Chmiela¹

¹Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

Wpłynęło w lutym 2013 r.

Spis treści: 1. Patogeneza choroby niedokrwiennej serca. 2. Choroba niedokrwiennej serca jako proces zapalny. 3. Markery reakcji zapalnej w chorobie niedokrwiennej serca. 4. Czynniki bakteryjne a choroba niedokrwiennej serca. 5. Podłoże autoimmunizacyjne choroby niedokrwiennej serca. 6. Białka szoku cieplnego (Hsp) – bodźce i tarcze w procesach z autoimmunizacji w chorobie niedokrwiennej serca. 7. Prozapalne działanie białek Hsp w chorobie niedokrwiennej serca. 8. Hipoteza cytotoksycznego działania przeciwciał przeciwko bakteryjnym białkom szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 60 i 65 kDa w chorobie niedokrwiennej serca. 9. Podsumowanie

Coronary heart disease versus *Helicobacter pylori* and *Chlamydomphila pneumoniae* bacterial infections – the role of heat shock proteins and the phenomenon of antigenic mimicry

Abstract: The end of the previous century brought new findings concerning the role of inflammation and the infectious agents in the development of atherosclerosis. However, it is still not clear whether and how the infectious agents participate in the formation and the development of the atherosclerotic plaque. This article discusses the findings which to confirm the hypothesis that the bacterial Hsp proteins are factors promoting the autoimmune reactions and pathological processes leading to coronary heart disease. The involvement of bacterial Hsp proteins in the atherosclerotic processes is probably based on the upregulation of anti-Hsp60 autoantibodies produced in response to infection with a pathogen which produces Hsp60. Since the Hsp proteins are very conservative, the antibodies produced in response to bacterial Hsp60 may react with the human analogue Hsp60 exposed on the surface of endothelium. The complexes of autoantibodies and human Hsp60 proteins may induce the complement dependent cytotoxicity and promote inflammatory damage of the vessels.

Contents: 1. Pathogenesis of coronary heart disease. 2. Coronary heart disease as an inflammatory process. 3. Markers of inflammation in coronary heart disease. 4. Bacterial factors and coronary heart disease. 5. Autoimmune background of coronary heart disease. 6. Heat shock proteins (Hsp) – the stimuli and the targets of autoimmune processes in coronary heart disease. 7. Proinflammatory action of Hsp proteins in coronary heart disease. 8. The hypothesis of the cytotoxic effect of antibodies against bacterial Hsp60 and Hsp65 proteins in coronary heart disease. 9. Summary

Słowa kluczowe: białka szoku cieplnego (Hsp), *Chlamydomphila pneumoniae*, choroba niedokrwiennej serca, *Helicobacter pylori*
Key words: *Chlamydomphila pneumoniae*, coronary heart disease, heat shock protein (Hsp), *Helicobacter pylori*

1. Patogeneza choroby niedokrwiennej serca

Choroba niedokrwiennej serca (ChNS) stanowi zespół dolegliwości będących następstwem przewlekłego stanu niedotlenienia i niedożywienia komórek mięśnia sercowego. ChNS objawia się uciskiem, pieczeniem, uczuciem ciężaru, dyskomfortu oraz dławienia w klatce piersiowej [59, 69].

Ze względu na rolę danego czynnika w patogenezie choroby wieńcowej wyodrębnia się następujące czynniki przyczynowe: palenie papierosów, nadciśnienie tętnicze, podwyższone stężenie cholesterolu całkowitego i frakcji lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL – low density lipoprotein), a obniżone stężenie frakcji lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL – high density lipoprotein) oraz cukrzyca; warunkowe: podwyższone stężenie trójglicerydów, nieprawidłowe stężenie lipoprotein, homocysteiny i czynników krzepnięcia, oraz czynniki

usposabiające: otyłość, brak aktywności fizycznej, choroba wieńcowa w wywiadzie rodzinnym, płeć, czynniki socjoekonomiczne, etniczne i behawioralne. Płeć może stanowić czynnik ryzyka w grupie osób zdrowych, szczególnie w związku z wiekiem. Przyjmuje się, że zachorowania na choroby wieńcowe mogą wystąpić w znacznie młodszym wieku u mężczyzn niż u kobiet. W grupie ryzyka obciążonej dodatnim wywiadem rodzinnym ryzyko wystąpienia wyżej wymienionych zmian dotyczy mężczyzn poniżej 45 roku życia i kobiet poniżej 55 [74, 79].

2. Choroba niedokrwiennej serca jako proces zapalny

Na przełomie XX i XXI wieku badania prowadzone nad chorobą niedokrwiennej serca wkroczyły w nową fazę. Zwrócono uwagę na rolę procesu zapalnego w rozwoju

* Autor korespondencyjny: Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16; tel. 42 635 45 25; e-mail: aga.matus@wp.pl

miażdżycy wskazując, iż jedną z głównych jej przyczyn jest miejscowa i uogólniona reakcja zapalna z udziałem komórek układu odpornościowego [30].

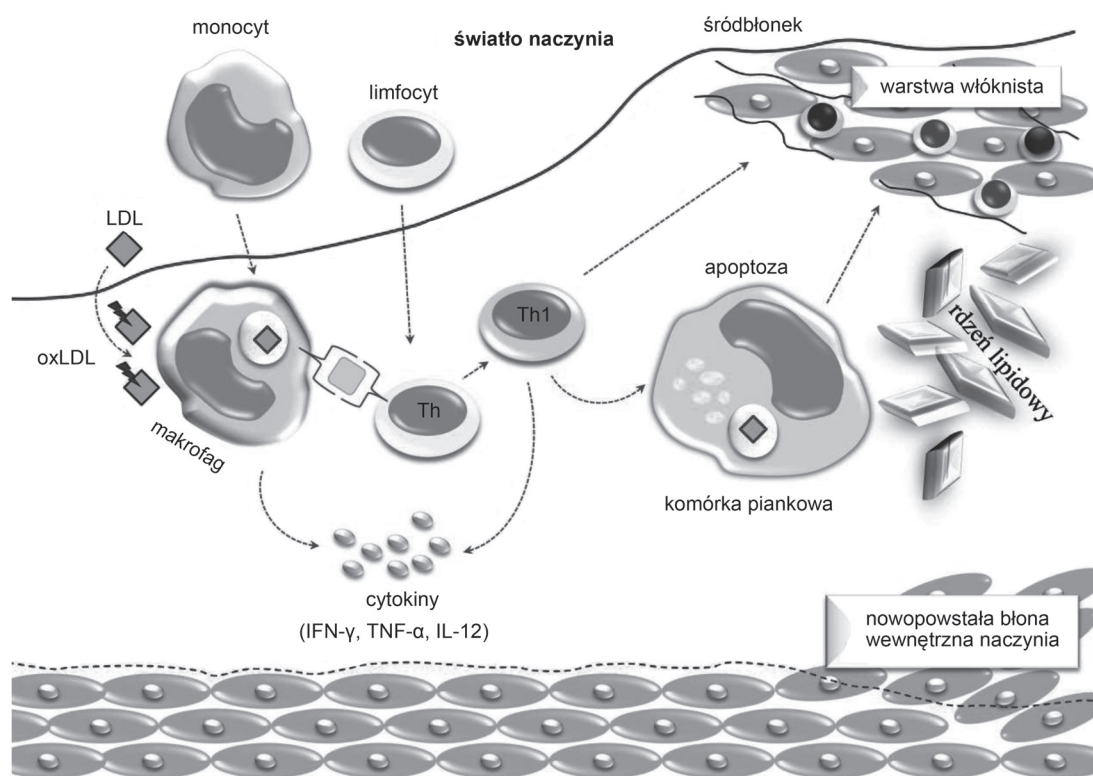
Trudno jest jednoznacznie wskazać czynniki inicjujące powstawanie ogniska zapalnego i tworzenie blaszki miażdżycowej. Jednakże wiadomo, że dysfunkcja śródbłonna i wysoki poziom cholesterolu odgrywają znaczącą rolę w procesie zapalnym, który cechuje napływ makrofagów do przestrzeni śródbłonkowej, wskutek zwiększonej migracji monocytów krwi obwodowej [54].

Monocyty przekształcają się w makrofagi, które rozpoznają i fagocytują utlenione cząsteczki lipoproteiny o niskiej gęstości – oxLDL (oxidised low-density lipoproteins). Białkowe składniki cząsteczek LDL są przetwarzane i prezentowane limfocytom T przez makrofagi, jak również przez komórki dendrytyczne w powiązaniu z cząsteczkami układu zgodności tkankowej – MHC (major histocompatibility complex) klasy II. Aktywowane w środowisku reakcji zapalnej makrofagi i limfocyty uwalniają chemokiny, które stymulują migrację komórek mięśni gładkich z mięśniówki, tworzących wraz z komórkami piankowatymi włóknistą powłokę. Proces ten ułatwiają interferon gamma – IFN- γ i czynnik martwicy guzów – TNF- α (tumor necrosis factor α), wydzielane przez limfocyty pomocnicze Th1 (T helper), jak również interleukina 12 (IL-12) produkowana przez makrofagi i komórki piankowate. Te ostatnie ulegają apoptozie, a powstałe nierozpuszczalne kryształy cho-

lesterolu tworzą powłokę lipidową blaszki miażdżycowej [54]. Potwierdzeniem, iż zmiany miażdżycowe są związane z reaktywnością komórek odpornościowych jest zwiększona ich liczba we wszystkich stadiach rozwoju ognisk miażdżycowych. Wykazano, iż główną populacją komórek w świeżo tworzących się zmianach miażdżycowych są limfocyty T, natomiast w ogniskach przetrwałych proporcja ta zostaje odwrócona na korzyść makrofagów. Gromadzące się w zmianach miażdżycowych makrofagi inicjują procesy odpornościowe poprzez prezentację antygenów limfocytom T oraz produkcję cytokin i chemokin [40, 73], rys. 1.

3. Markery reakcji zapalnej w chorobie niedokrwiennej serca

Na liście wskaźników stanu zapalnego, które korelują z ryzykiem powstania zmian miażdżycowych znajdują się m.in.: mieloperoksydaza i metaloproteiny zgromadzone w ziarnistościach neutrofilów i makrofagów. Mieloperoksydaza przyczynia się do wędrówki leukocytów oraz akumulacji komórek piankowatych i przez to pośrednio do dysfunkcji śródbłonna, indukując ich apoptozę, co skutkuje pęknięciem blaszki miażdżycowej i jej destabilizacją. Efektem powstających uszkodzeń jest uwalnianie czynnika tkankowego oraz aktywacja kaskady krzepnięcia krwi. Mieloperoksydaza,



Rys. 1. Powstawanie blaszki miażdżycowej w aspekcie procesu zapalnego

(LDL – lipoproteina o niskiej gęstości, oxLDL – utlenione cząsteczki LDL, limfocyty Th – limfocyty T pomocnicze, IFN- γ – interferon gamma, TNF- α – czynnik martwicy guzów α , IL-12 – interleukina 12)

zużywając śródbłonkowy tlenek azotu zmniejsza jego dostępność w śródbłonku oraz hamuje jego czynność rozkurczową i przeciwzapalną. Ponadto bierze udział w oksydacyjnej modyfikacji LDL do form aterogennych, rozpoznawanych przez receptory makrofagów [61]. Istotnymi markerami reakcji zapalnej, aktywowanymi przez mieloperoksydazę są wydzielane przez makrofagi metaloproteiny, niszczące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej m.in. elastynę i kolagen. Rozkład tych białek prowadzi do destabilizacji blaszki miażdżycowej. Metaloproteiny uczestniczą także w procesie peroksydacji lipidów i przyspieszaniu zużycia tlenu azotu [73].

Również białko C-reaktywne – CRP (C reactive protein) należące do białek fazy ostrej, którego stężenie w osoczu rośnie w odpowiedzi na zakażenie lub uszkodzenie tkanek, stanowi ważny marker procesu zapalnego i jest uznawane za wskaźnik wystąpienia incydentu wieńcowego powiązanego z uszkodzeniem komórek śródbłonka. Stężenie CRP jest skorelowane z podwyższonym stężeniem IL-6, TNF- α , otyłością i insulinoopornością, co może wskazywać na związek pomiędzy przewlekłym zapaleniem a dysfunkcją śródbłonka naczyniowego [13]. Wykazano, że CRP jest lepszym wskaźnikiem wystąpienia incydentu wieńcowego niż frakcja LDL cholesterolu, gdyż kobiety z wysokim stężeniem CRP i niskim LDL były bardziej narażone na ostrą niewydolność wieńcową w porównaniu z tymi, które charakteryzowały się wysokim stężeniem LDL a niskim CRP [67].

4. Czynniki bakteryjne a choroba niedokrwienna serca

Przewlekły stan zapalny towarzyszy również wielu chorobom zakaźnym, stąd rozpatruje się wpływ zakażeń wirusem *Herpes simplex*, a także zakażeń bakteryjnych, najczęściej *Chlamydomphila pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i *Mycoplasma pneumoniae* na rozwój choroby niedokrwiennej. Reakcja zapalna inicjowana wskutek takich zakażeń jest powiązana z nasileniem ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor) [9, 13].

Różne mechanizmy związane z chorobami zakaźnymi mogą mieć wpływ na rozwój choroby niedokrwiennej serca. Niektóre z nich wynikają z obecności czynnika zakaźnego w ścianie naczynia i wiążą się z lokalną reakcją zapalną oraz nasiloną proliferacją komórek mięśni gładkich. Częściej jednak procesy patologiczne towarzyszące chorobie wieńcowej są wynikiem przewlekłej reakcji zapalnej, reakcji o charakterze autoimmunologicznym oraz modyfikacji klasycznych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca przez czynniki zakaźne [9].

Chlamydomphila pneumoniae. Gatunek *C. pneumoniae* należy do patogenów wewnątrzkomórkowych charakteryzujących się ograniczoną aktywnością

metaboliczną, potwierdzoną przez brak zdolności syntezy ATP. Na własne potrzeby bakterie te wykorzystują ATP pochodzące z zakażonych komórek. W ich ścianie komórkowej występuje lipopolisacharyd (LPS), brak jest natomiast peptydoglikanu [38]. Formami zakażającymi komórki gospodarza są, posiadające nukleoid, ciała elementarne (EB – elementary body), które wewnątrz komórek docelowych przekształcają się w metabolicznie aktywne ciała siateczkowate (RB – reticulate body), nie zawierające nukleoidu [7]. Z niejasnych przyczyn ciała siateczkowate mogą przekształcać się w ciała przetrwalne (PB – persistent body), cechujące się zdolnością długotrwałego pozostawania w komórce gospodarza. Formy takie najprawdopodobniej odpowiedzialne są za rozwój zakażeń przewlekłych [7, 38]. Charakterystyczną dla *C. pneumoniae* cechą jest zdolność namnażania się w różnego rodzaju komórkach, między innymi w makrofagach lub w komórkach mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych [2].

C. pneumoniae powoduje zakażenia wyłącznie u ludzi pod postacią zapalenia płuc, astmy oskrzelowej i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [7, 38].

Wśród czynników chorobotwórczości *C. pneumoniae* wyróżnia się antygeny grupowo swoiste (kompleks lipopolisacharydowy wspólny dla wszystkich przedstawicieli rodzaju *Chlamydomphila*) oraz antygeny gatunkowo swoiste (białko błony zewnętrznej – omp1, odgrywające istotną rolę w utrzymaniu integralności ściany komórkowej ciałek elementarnych oraz białko szoku cieplnego – cHsp o wysokim stopniu homologii z ludzkim białkiem Hsp60) [27, 65].

S a i k k u, w 1988 roku, jako pierwszy zwrócił uwagę na rolę zakażeń *C. pneumoniae* w rozwoju choroby niedokrwiennej serca wykazując, że u osób z zawałem mięśnia sercowego aż 65% badanych posiadało przeciwciała przeciwko *C. pneumoniae* [70]. W późniejszych badaniach T h o m i wsp. dowiedli, że podwyższony poziom takich przeciwciał blisko trzykrotnie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [80]. W badaniach własnych wykazano istotnie wyższą częstość zakażeń *C. pneumoniae*, zwłaszcza zakażeń o charakterze przewlekłym, u pacjentów z objawową chorobą wieńcową w porównaniu do osób zdrowych [50].

Do chwili obecnej nie wiadomo w jaki sposób zakażenie *C. pneumoniae* wpływa na powstawanie blaszek miażdżycowych. Przypuszcza się, że bakterie mogą rozwijać się w obrębie tych struktur. Przemawia za tym sposób przenoszenia zakażenia tymi drobnoustrojami z człowieka na człowieka drogą kropelkową, ich transport za pośrednictwem makrofagów, jak również potwierdzone występowanie i namnażanie się w śródbłonku naczyniowym. *C. pneumoniae* obecne w makrofagach aktywują wytwarzanie metaloproteinaz, które, jak już zaznaczono, uszkodzają tkankę łączną w obszarze

blaszki miażdżycowej. Udowodniono także, iż rozwój *C. pneumoniae* w śródbłonku nasila procesy zakrzepowe [15, 38]. Przewlekłym lub nawracającym infekcjom *C. pneumoniae* towarzyszy wzrost stężenia fibrynogenu, czynnika von Willebranda, cholesterolu LDL i białka CRP w surowicy krwi [6]. Potwierdzono również, że *C. pneumoniae* w zakażonych komórkach aktywuje wytwarzanie wielu cytokin, m.in. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i MCP-1 (macrophage chemotactic protein) [34].

Związek zakażenia *C. pneumoniae* z chorobą niedokrwienną serca może mieć podłoże autoimmunologiczne, spowodowane reakcjami krzyżowymi pomiędzy białkami szoku cieplnego tych bakterii oraz komórek gospodarza i skierowanymi przeciwko nim przeciwciałami. Zakażenie *C. pneumoniae* wzbudza zarówno komórkową, jak i humoralną odpowiedź immunologiczną gospodarza. Kluczową rolę w eliminacji zakażenia odgrywa odpowiedź typu komórkowego z udziałem limfocytów T CD8+, które do pełnej aktywacji wymagają IFN- γ , wytwarzanego przez limfocyty T pomocnicze pobudzone przez antygeny *C. pneumoniae* [21, 27].

Gdy odpowiedź komórkowa adaptacyjna swoista zawodzi wówczas zakażenie przybiera postać przewlekłą i taki jest też charakter towarzyszącej mu reakcji zapalnej, która może doprowadzić do rozwoju procesów patologicznych [78].

Helicobacter pylori. Od chwili odkrycia pałeczek *H. pylori* przez Warrena i Marshalla w 1982 roku i wykazania ich roli w rozwoju choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy powszechnie przyjmuje się, że choroba ta ma charakter zakaźny i jest wynikiem kolonizacji nabłonka żołądka przez te bakterie. Późną konsekwencją takich zakażeń może być rozwój zmian nowotworowych o charakterze chłoniaka MALT (mucosa associated lymphoid tissue) lub gruczolakoraka [47].

Do czynników ryzyka zakażeń *H. pylori* należy niski status socjo-ekonomiczny, gęstość zaludnienia, złe warunki sanitarne oraz predyspozycje genetyczne. W trakcie rozwoju zakażenia różne czynniki *H. pylori*, między innymi ureaza, toksyna wakuolizująca – VacA (vacuolating cytotoxin A), białko CagA związane z cytotoksyną (cytotoxin associated gene A antigen), inicjują ostrą reakcję zapalną, która z czasem przybiera charakter przewlekły. Najważniejszym czynnikiem chorobotwórczości pałeczek *H. pylori* jest ureaza, która neutralizuje kwaśny odczyn soku żołądkowego, stwarzając tym bakteriom warunki do wzrostu. Ureaza jest także ważnym czynnikiem prozapalnym [45].

Po raz pierwszy na możliwą rolę zakażenia *H. pylori* w rozwoju choroby niedokrwiennej serca uwagę zwrócił Mendall i wsp. w 1994 roku, wykazując podwyższony poziom przeciwciał przeciwko antygenom *H. pylori* u większości pacjentów z chorobą wieńcową [53]. Z kolei Amersio i wsp. wykryli DNA *H. pylori*

w blaszkach miażdżycowych, czemu towarzyszyła nasilona ekspresja cząsteczek ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) [1].

W wielu badaniach wykazano, że u osób zakażonych *H. pylori*, podobnie jak u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, występuje podwyższony poziom cholesterolu całkowitego i trójglicerydów, przy jednoczesnym obniżeniu frakcji HDL w surowicy krwi. Wskazuje to na możliwy wpływ przewlekłej infekcji na metabolizm lipidów, co jest związane ze zwiększonym ryzykiem choroby wieńcowej [42, 56]. W surowicach osób zakażonych *H. pylori* występuje podwyższone stężenie cytokin zapalnych, głównie IL-6, IL-8 i TNF- α , jak również fibrynogenu, inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu typu 1 oraz czynnika von Willebranda, który stanowi czuły wskaźnik jawnej klinicznie miażdżycy i jest czynnikiem prognostycznym wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego [17]. Nasila się także produkcja białka C-reaktywnego [85] oraz agregacja płytek krwi, co sprzyja tworzeniu mikrozakrzepów. Natomiast alkalizacja środowiska żołądka związana z zakażeniem *H. pylori* sprzyja wzrostowi stężenia homocysteiny w surowicy krwi, co z kolei ogranicza wchłanianie kwasu foliowego i witaminy B₁₂ [17].

W nasilaniu procesu zapalnego towarzyszącego miażdżycy nie wyklucza się udziału lipopolisacharydu pałeczek *H. pylori*, który stymuluje wydzielanie przez makrofagi TNF- α , o działaniu hamującym aktywność lipazy lipoproteinowej. Pociąga to za sobą wzrost poziomu trójglicerydów i obniżenie stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy. W badaniach, w których podawano myszom LPS *H. pylori* przez 10 dni, utrzymując warunki przewlekłej infekcji, zaobserwowano nasilenie zmian miażdżycowych i znacznie wyższy poziom przeciwciał przeciwko oxLDL w porównaniu do zwierząt kontrolnych [58]. Dowiedziono również, że w blaszce miażdżycowej pod wpływem oxLDL, nasila się ekspresja receptora TLR4 (toll-like receptor 4) wiążącego LPS [93]. Unkelbach i wsp. nie wykluczyli, iż polimorfizm genów kodujących receptory CD14 i TLR4, pośredniczących w aktywacji komórek odpornościowych przez LPS, może determinować rozwój choroby wieńcowej [12, 84]. Z kolei Hajra i wsp. wykazali nasilenie aktywacji NF- κ B oraz ekspresji E-selektyny i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) w komórkach śródbłonka naczyń myszy transgenicznych pozbawionych receptora dla LDL, stymulowanych lipopolisacharydem [20]. Przewlekłe zakażenie *H. pylori* sprzyja tworzeniu się kompleksów LPS-LDL, ze współudziałem białka wiążącego lipopolisacharyd – LBP (lipopolisaccharide binding protein). Kompleksy takie, deponowane w śródbłonku naczyń, mogą nasilać procesy miażdżycowe związane z reakcją zapalną [88]. Duzendorfer i wsp. wykazali, że białko LBP jest niezbędne do aktywacji przez LPS komórek śródbłonka tętnic wieńcowych,

które posiadają wewnątrzkomórkowy receptor TLR4, a białko LBP spełnia funkcję katalizatora przenoszącego kompleks utworzony z surowiczego białka sCD14 i LPS do wnętrza komórek [11]. Wobec tego niezwykle ważną wydaje się informacja o wzroście stężenia LBP w surowicy wraz z nasileniem objawów choroby wieńcowej i podczas zakażenia *H. pylori* [19]. Nie wyklucza się, iż LPS *H. pylori* może sprzyjać rozwojowi choroby niedokrwiennej serca również poprzez zdolność obniżania aktywności fagocytarnej komórek żernych [77], a także osłabianie aktywności cytotoksycznej komórek NK [68] i proliferacyjnej limfocytów [18].

Intensywność reakcji zapalnej towarzyszącej zakażeniom *H. pylori* jest skorelowana z ekspresją białek CagA i VacA u szczepów typu I (CagA+VacA+). Zakażeniom takim towarzyszy wzrost poziomu trombiny – czynnika VII C oraz fragmentów F 1+2 protrombiny [17]. Podczas reakcji zapalnej rozwijającej się wskutek takich zakażeń odsłaniają się prawdopodobnie antygeny komórek śródbłonna i mięśni gładkich w blaszkach międzycygowych eksponowane na działanie przeciwciał anty-CagA. Powstawanie takich kompleksów immunologicznych wiąże się z ryzykiem dalszych uszkodzeń śródbłonna zależnych od kompleksu litycznego białek dopełniacza [14].

Zależność między zakażeniami *H. pylori* a podatnością na rozwój choroby wieńcowej potwierdzają badania prowadzone na materiale pochodzącym od osób poddanych leczeniu w celu eliminacji pałeczek *H. pylori* z organizmu, u których stężenie trójglicerydów, IL-1, IL-8 oraz TNF- α znacznie obniżało się. Po zakończeniu ukierunkowanego leczenia przeciwko *H. pylori*, z zastosowaniem antybiotyków, średnica światła naczyń krwionośnych była większa niż u chorych, u których nie wdrożono antybiotykoterapii [37].

5. Podłoże autoimmunizacyjne choroby niedokrwiennej serca

Rola patogenów bakteryjnych w chorobie niedokrwiennej serca jest coraz częściej rozpatrywana jako proces autoimmunizacyjny związany z podobieństwem antygenowym struktur gospodarza i czynników zakaźnych, które mogą inicjować krzyżową aktywność autoreaktywnych limfocytów T i B. Zjawisko to jest definiowane jako mimikra antygenowa. Mechanizmy efektorowe odpowiedzi immunologicznej rozwijającej się z udziałem komórek odpornościowych gospodarza mogą być kierowane zarówno przeciwko strukturom występującym u drobnoustrojów, jak i tym zlokalizowanym w komórkach gospodarza. Różne białka, które posiadają zbliżoną strukturę trzeciorzędową mogą indukować podobną odpowiedź serologiczną. Struktury identyczne lub podobne do komponentów komórek

gospodarza zidentyfikowano u wielu patogenów bakteryjnych m.in. *C. pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *H. pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, a także u wirusów i grzybów [94].

Mimikra antygenowa jest też podstawą „hipotezy zakaźnej”, która zakłada, że powszechne w populacji ludzkiej choroby, m.in. choroby neurodegeneracyjne, choroby tkanki łącznej, a także choroba niedokrwiennej serca są następstwem chorób zakaźnych.

Na modelu mysim wykazano, że skutkiem zakażenia *Chlamydia* jest zapalenie mięśnia sercowego, w którego rozwoju kluczową rolę odgrywają przeciwbakteryjne przeciwciała przyczyniające się do uszkodzenia mięśnia sercowego. Przeciwciała takie mogą być inicjowane przez białko błony zewnętrznej, którego sekwencja aminokwasowa jest podobna do sekwencji łańcucha ciężkiego alfa miozyny, występującej w mięśniu sercowym ludzi. Przypuszcza się, że zarówno *Chlamydia*, jak i pałeczki *H. pylori* mogą nasilać u osób zakażonych objawy choroby niedokrwiennej serca poprzez indukowanie reakcji autoimmunologicznych, inicjowanych przez białka szoku cieplnego [43]. Wykazano między innymi wpływ białka HspB *H. pylori* o masie cząsteczkowej 60 kDa na produkcję cytokin i adhezyn komórkowych, a także metaloproteina z pochodzenia makrofagowego, których znaczenie w rozwoju choroby niedokrwiennej serca jest dobrze udokumentowane [51]. Matsura i wsp. sugerują, że białko HspB *H. pylori* może sprzyjać rozwojowi choroby niedokrwiennej serca poprzez nasilenie wytwarzania IFN- γ i IL-12 przez limfocyty pomocnicze Th1 [48].

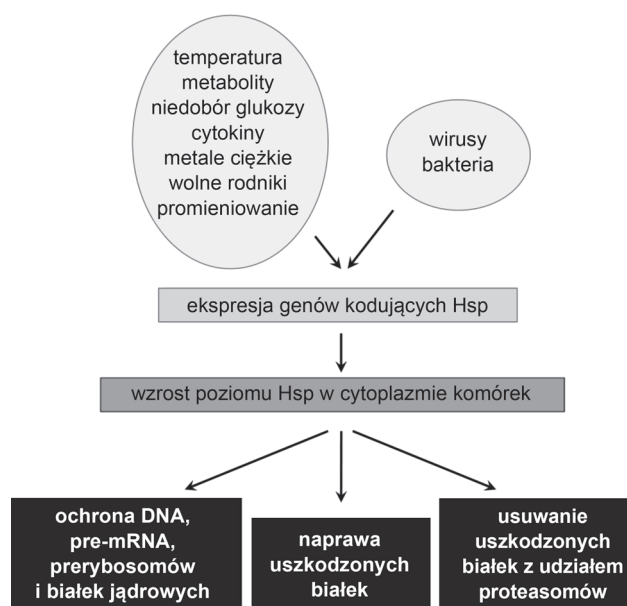
Wielu autorów odnosi mimikrę antygenową, będącą podłożem reakcji zapalnej w przebiegu choroby niedokrwiennej serca, do determinantów antygenowych Lewis (Le). Determinanty takie obecne na komórkach ludzkich stanowią ligandy dla cząsteczek adhezyjnych, ulegających ekspresji w śródbłonku naczyń krwionośnych (E i P-selektyna) oraz na leukocytach (L-selektyna) [16]. Wiązanie selektyn z determinantami Le kieruje migracją limfocytów do ogniska zapalenia i odgrywa ważną rolę w skupianiu komórek odpornościowych w obwodowych węzłach chłonnych. Wykazano, iż pałeczki *H. pylori* posiadające antygeny Le w łańcuchach o-swoistych LPS, wiążą E i L-selektyny, co może wskazywać na rolę takich interakcji w przewlekłym procesie zapalnym poprzez rekrutację komórek zapalnych, a także przetrwanie pałeczek *H. pylori* w śródbłonku [16]. Aktywność LPS *H. pylori* wyraża się także pobudzeniem monocytów i makrofagów do wydzielania cytokin prozapalnych, tj. IL-1, IL-6 czy IL-8 [18]. Szczepy z ekspresją determinantów LeX lub LeA przyciągają krążące limfocyty poprzez L-selektynę [16], o czym świadczy dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją determinantów Le u *H. pylori* a nasileniem kolonizacji

oraz napływem neutrofilów i limfocytów do błony śluzowej żołądka u pacjentów zakażonych *H. pylori*. Także u pacjentów z owrzodzeniem żołądka, zakażonych *H. pylori* z ekspresją LeX, obserwowano silny naciek neutrofilów [24].

6. Białka szoku ciepłego (Hsp) – bodźce i tarcze w procesach z autoimmunizacji w chorobie niedokrwiennej serca

Wysocze konserwatywne białka szoku ciepłego (heat shock proteins – hsp) mogą stanowić zarówno bodziec, jak i struktury docelowe w procesach patologicznych wynikających z autoimmunizacji. Są homogenną grupą około 20 białek występujących we wszystkich poznanych organizmach, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych [66]. Po raz pierwszy zostały opisane przez Ritossa u *Drosophila melanogaster* w 1962 roku. Rozmieszczenie tych cząstek w komórkach uwarunkowane jest ich powinowactwem do określonych organelli lub występowaniem właściwych dla nich substratów. W prawidłowo funkcjonującej komórce białka Hsp gromadzą się w siateczce śródplazmatycznej, gdzie zachodzi biosynteza białka, jak również w mitochondriach i lizosomach. Natomiast podczas podziału komórki związane są z cytoszkieletem, stabilizując i chroniąc go przed reorganizacją w niekorzystnych warunkach. Podczas stresu poziom Hsp w cytoplazmie wzrasta, następnie białka te są transportowane do jądra komórkowego, gdzie chronią DNA, pre-mRNA, prerybosomy i białka jądrowe przed uszkodzeniem i degradacją, aktywują także różne geny. Ekspresja genów kodujących białka szoku ciepłego jest indukowana przez wiele czynników szkodliwych, m.in. temperaturę, trucizny metaboliczne, analogi aminokwasów, niedobór glukozy, cytokiny, alkohole, metale ciężkie, wolne rodniki, różne typy promieniowania, zakażenia wirusowe i bakteryjne, a także niesteroidowe leki przeciwzapalne [33, 82], rys. 2.

Na podstawie mas cząsteczkowych i różnic w strukturze pierwszorzędowej polipeptydów, wśród białek szoku ciepłego wyróżniono następujące podgrupy: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 i Hsp niskocząsteczkowe o masie cząsteczkowej w zakresie od 8,5 do 40 kDa. Nazewnictwo takie przyjęto w trakcie konferencji w Cold Spring Harbor w 1996 roku [81, 82]. Białka Hsp stanowią 5–10% wszystkich białek organizmu, chronią komórki przed działaniem czynników stresowych, zarówno zewnątrzkomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych (metaboliety), pełniąc jednocześnie ważne funkcje w procesach fizjologicznych. Plejotropowa aktywność białek Hsp związana jest z tworzeniem przez nie przejściowo kompleksów z innymi białkami. Może to powodować zmianę ich konformacji, co pozwala na ich przemieszczanie się przez błony biologiczne do róż-



Rys. 2. Czynniki indukujące ekspresję genów kodujących białka szoku ciepłego – Hsp i rola tych białek na poziomie komórkowym

nych organelli komórkowych. Hsp uczestniczą również w procesie naprawy uszkodzonych białek, umożliwiając im powrót do postaci natywnej. Jeśli jednak defekty są na tyle duże, że nie jest to możliwe, to pośredniczą w usuwaniu uszkodzonych cząsteczek z udziałem proteasomów [33, 41].

Hsp o aktywności opiekuńczej stabilizują lub przywracają natywną formę chronionym białkom dzięki powinowactwu do regionów hydrofobowych polipeptydów lub częściowo rozwiniętego białka. W wyniku nieprecyzyjnego działania systemu ochrony komórki, mogą powstawać nierozpuszczalne agregaty białkowe, usuwane w wyniku hydrolizy stymulowanej przez Hsp lub też dzięki ich aktywności proteolitycznej. Białka opiekuńcze odgrywają także istotną rolę w transporcie wewnątrzkomórkowym innych białek, a także w sygnalizacji komórkowej oraz regulacji ekspresji genów [82].

Do grupy Hsp60 należy zarówno białko mitochondrialne (mt-Hsp), jak i cytoplazmatyczne. Białko mitochondrialne funkcjonuje w dynamicznej równowadze pomiędzy monomerami, heptamerami i tetradekamerami. Ich dysocjacji do monomerów następuje przy niskim stężeniu tego białka, natomiast do tworzenia tetradekamerów w obecności ATP i mitochondrialnego Hsp10, jako kofaktora mt-Hsp60. Cytoplazmatyczne białko Hsp60 tworzone jest przez formy heterooligomeryczne i bierze udział w łączeniu białek cytoszkieletu tj. aktyny i tubuliny [81].

Białka szoku ciepłego mogą stawać się immunogenne wskutek zmian strukturalnych lub potranslacyjnej modyfikacji autogennych Hsp w wyniku zaburzeń metabolicznych lub procesów oksydacyjnych. Zakłada się również możliwość tworzenia kompleksów białek

Hsp z własnymi lub obcymi antygenami, które mogłyby stymulować limfocyty B do wytwarzania przeciwciał rozpoznających białka Hsp [66].

Mimo, iż samo białko Hsp60 nie aktywuje dopełniacza, to w kompleksie z przeciwciałami nabywa taką właściwość [64]. Powstanie aktywnych białek dopełniacza w procesie kaskadowej aktywacji inicjowanej przez kompleksy immunologiczne może ostatecznie doprowadzić do uszkodzenia tkanek własnych i rozwoju zmian patologicznych. Tradycyjne czynniki rozwoju miażdżycy, tj. nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia, oxLDL, palenie tytoniu, uszkadzając komórki śródbłonna, doprowadzają do wzrostu ekspresji Hsp [65], przez co ryzyko powikłań wynikających z tworzenia kompleksów immunologicznych wzrasta u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca.

7. Prozapalne działanie białek Hsp w chorobie niedokrwienną serca

Jedną z możliwości udziału białek szoku cieplnego, zarówno ludzkich, jak i bakteryjnych, w rozwoju choroby niedokrwienną serca, jest stymulacja przez nie komórek śródbłonna naczyniowego za pośrednictwem receptora CD14 i kinazy białkowej p38 do wydzielania cytokin prozapalnych, m.in. IL-6 i TNF- α [36, 54]. W doświadczeniach z użyciem przeciwciał blokujących receptory TLR-2 i TLR-4, wykazano zahamowanie proliferacji limfocytów T w odpowiedzi na bakteryjne lub ludzkie białko Hsp, w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i z chorobą wieńcową [22].

Silnym działaniem prozapalnym cechuje się białko Hsp60 występujące w strukturach powierzchniowych pałeczek *H. pylori*. Wykazano, że stymuluje ono komórki linii monocytów ludzkich THP-1 do wytwarzania IL-1 β , IL-8, TNF- α i IL-8 [44]. Jego stężenie jest wyższe w plazmie pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, w porównaniu do zdrowych dawców. Stwierdzono także, że u osób palących tytoń, z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą, z podwyższonym stężeniem białka Hsp60 i swoistych wobec niego przeciwciał, częściej pojawiają się objawy choroby wieńcowej, niż u osób, u których wymienione wskaźniki pozostają w normie. Zhang i wsp. wykazali wzrost stężenia Hsp60 w plazmie pacjentów na dzień przed i dzień po wystąpieniu ostrego incydentu wieńcowego i stopniowe jego obniżenie po siedmiu dobach [97].

Sugeruje się, że zarówno egzogenne, jak i endogenne białka Hsp mogą przyczynić się do rozwoju reakcji zapalnej w ścianach naczyń krwionośnych, a także powodować destabilizację blaszki miażdżycowej. Ludzkie i bakteryjne Hsp aktywują komórki śródbłonna naczyniowego, makrofagi, a także komórki mięśni gładkich, co wyraża się nasileniem ekspresji cząsteczek

adhezyjnych i wytwarzaniem białka CRP, fibrynogenu oraz amyloidu A [3].

Stwierdzono, że Hsp wytwarzane przez *C. pneumoniae* regulują ekspresję metaloproteinaz i sekrecję TNF- α w komórkach gospodarza. Przypuszcza się, że ma to związek z wykorzystywaniem przez te drobnoustroje składników pokarmowych pochodzących z zasiedlanych komórek. Do wzrostu stężenia Hsp we krwi gospodarza dochodzi prawdopodobnie w momencie wysiewu bakterii, po zakończeniu fazy wewnątrzkomórkowego namnażania [6].

Również odpowiedź Th1, będąca reakcją na zakażenie *H. pylori*, może przyczynić się do wystąpienia zmian miażdżycowych. Z powodu znacznej homologii sekwencji aminokwasowych ludzkiego Hsp60 i białka Hsp60 *H. pylori* (Hp-Hsp60) limfocyty Th1 o swoistości wobec bakteryjnego Hsp napływające do błony śluzowej żołądka, mogą być aktywowane i przyciągane przez endogenne cząsteczki Hsp60 kumulowane na powierzchni śródbłonna, w odpowiedzi na czynniki stresogenne, tj. nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemię czy cytokiny. Niektóre peptydy ludzkiego białka Hsp60 zostały wykryte w strukturze limfocytów T CD4+, co może generować autoimmunologiczne zmiany miażdżycowe. Wykazano, że modulacja równowagi Th1/Th2 w kierunku redukcji odpowiedzi Th1, w trakcie immunizacji białkiem Hsp60 *H. pylori*, skutkuje zmniejszeniem rozmiaru blaszek miażdżycowych. Również terapia eradykacyjna *H. pylori* prowadzi do ograniczenia takich zmian, ponieważ eliminacja czynnika zakaźnego przywraca równowagę Th1/Th2. Można zatem przypuszczać, iż redukcja limfocytów Th1 (CD4+) swoistych wobec Hsp60 *H. pylori* może przyczynić się do ograniczenia rozwoju zmian miażdżycowych. W badaniach *in vitro* wykazano, iż limfocyty Th1 aktywowane Hp-Hsp60, pochodzące od myszy zakażonych *H. pylori*, przenikały przez barierę komórek śródbłonna. Natomiast nieaktywowane takim białkiem limfocyty izolowane od myszy zakażonych *H. pylori* nie przekraczały bariery śródbłonna. Kiedy komórki śródbłonna poddano działaniu przeciwciał IgG przeciwko Hsp60 *H. pylori* aktywowane Hp-Hsp60 limfocyty Th1 traciły zdolność wnikania pomiędzy komórki śródbłonna [4].

Rozpuszczalne białka Hsp (sHsp) mogą być uwalniane z komórek ludzkich lub bakteryjnych podczas stresu fizycznego, chemicznego i biologicznego. Mogą być także produkowane przez komórki zapalne poddane działaniu cytokin. Źródłem rozpuszczalnych białek sHsp mogą być również komórki apoptotyczne i uszkodzone mechanicznie [46]. Stwierdzono wzrost stężenia sHsp u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i z miażdżycą tętnicy szyjnej oraz jego związek z grubością ścian tętnic. U niektórych pacjentów poziom tego białka przekraczał 1 mg/l [63, 90].

Choć większość badaczy wskazuje na wzrost stężenia białka Hsp60 w surowicy osób z chorobą niedokrwienną serca, to Zhang i wsp. nie potwierdzili związku między poziomem tego białka a czynnikami ryzyka tej choroby tj. paleniem tytoniu, nadciśnieniem tętniczym, hipercholesterolemią, cukrzycą oraz płcią w grupie osób zdrowych. Wykazali natomiast, iż stężenie tego białka zwiększa się w surowicach osób zdrowych wraz z wiekiem. U osób z podwyższonym stężeniem Hsp60 częstość choroby niedokrwiennej serca była pięciokrotnie wyższa niż u osób z niskim stężeniem tego białka w surowicy [97].

W 2009 roku Zhang i wsp. zasugerowali udział białek Hsp60, Hsp70 i Hsp90α w patogenezie raka jelita grubego, natomiast nie potwierdzili ich związku z nasileniem choroby nowotworowej [95].

W kontekście choroby niedokrwiennej serca, zainteresowanie wzbudzają: białko Hsp22, ponieważ jest produkowane wyłącznie w kardiomiocytach oraz białko Hsp27 produkowane zarówno przez kardiomiocyty, jak i komórki śródbłonna naczyniowego [5, 52, 75]. Obiecujące wydają się wyniki badań Józefowicz-Okonkwo i wsp., którzy wykazali istotną statystycznie różnicę w stężeniu surowiczego białka Hsp27 u pacjentów z objawami stabilnej dusznicy bolesnej ze zwężeniem tętnicy wieńcowej, w odniesieniu do osób zdrowych. Rozważa się znaczenie tego białka jako markera diagnostycznego w chorobie niedokrwiennej serca. Zwraca uwagę fakt, iż stężenie Hsp27 jest wprost proporcjonalne do masy niedokrwionego mięśnia sercowego, jak również stopnia zwężenia naczyń krwionośnych [31]. Kuch sugeruje, że oznaczanie stężenia tego białka może być przydatne w diagnozowaniu form pośrednich choroby niedokrwiennej serca, pomiędzy wczesnym stadium a niestabilnością wieńcową. Badania udziału niskocząsteczkowych białek szoku cieplnego w rozwoju choroby wieńcowej są nieliczne i pozostają jak dotąd w fazie wstępnej [39].

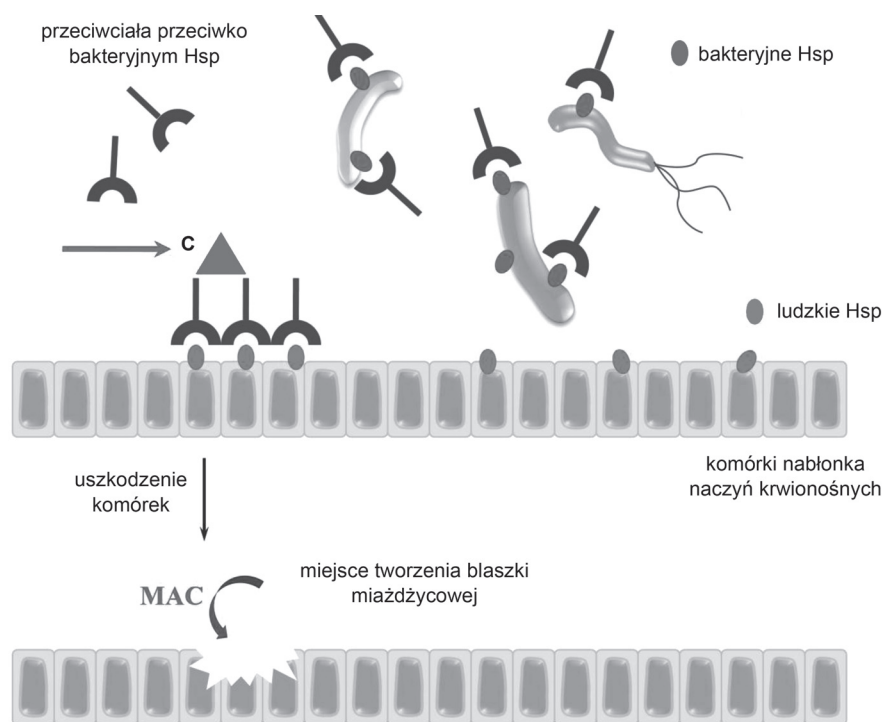
Nie wyklucza się znaczenia haplotypów genu *hsp60* jako czynników sprzyjających wystąpieniu choroby niedokrwiennej serca. W badaniach 4 wariantów polimorficznych genu *hsp60*, wynikających z podstawienia pojedynczych nukleotydów: rs2340690, rs788016, rs2305560 i rs2565163, przeprowadzonych z udziałem ponad tysiąca uczestników wykazano, iż w przypadku osób z haplotypem GCTC istnieje dwukrotnie wyższe ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej niż u osób z haplotypem GTTC (OR=1,91, 95% CI: 1,26–2,89, p=0,002). Wyniki te mogą sugerować związek haplotypu GCTC *hsp60* z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób układu krążenia [23]. Zamiana C na G w regionie promotorowym Hsp60/Hsp10 (3054–3712), w pozycji 3175, jest związana z podwyższonym stężeniem Hsp60 w surowicach u ludzi. U 40% pacjentów z genotypem GG wykrywano białko Hsp60 w stężeniu

wyższym niż 1000 ng/ml, podczas gdy u osób z genotypem CC lub CG odsetek ten wynosił odpowiednio 26% i 23,3% [72].

8. Hipoteza cytotoksycznego działania przeciwciał przeciwko bakteryjnym białkom szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 60 i 65 kDa w chorobie niedokrwiennej serca

Pierwsze przypuszczenia o udziale przeciwciał anty-Hsp60 i anty-Hsp65 w patogenezie choroby niedokrwiennej serca wywodzą się z badań opublikowanych przez Maura i wsp. w 1999 roku [51]. Rok później Pockley i wsp. wykazali podwyższone stężenie białka Hsp60 i przeciwciał przeciwko Hsp65 w surowicach pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, co pozostawało w związku z przyspieszonym tworzeniem się zmian miażdżycowych u osób z taką dolegliwością [63].

Rola białek szoku cieplnego w procesie aterogenezy jest prawdopodobnie ściśle związana z podwyższonym poziomem przeciwciał przeciwko białkom Hsp60 i Hsp65 [65]. Ich powstawanie mogą indukować bakteryjne białka szoku cieplnego zwłaszcza te, które mają charakter antygenów powierzchniowych. Duży konserwatyzm struktury tych białek może być przyczyną wystąpienia immunologicznych reakcji krzyżowych między bakteryjnymi białkami Hsp a ich ludzkimi homologami, np. białkiem o masie 60 kDa (hHsp60). W związku z tym mechanizm ochrony komórki przed szkodliwymi warunkami środowiskowymi może doprowadzić do inicjacji procesów autoimmunologicznych, stanowiących przyczynę uszkodzeń komórek śródbłonna, stanowiących niszę do tworzenia blaszki miażdżycowej. Zatem ludzkie białka szoku cieplnego mogą stać się celem krzyżowej reakcji odpornościowej zainicjowanej przez antygeny często występujących u ludzi patogenów bakteryjnych, do których zalicza się m.in. *H. pylori* i *C. pneumoniae*. Wykazano, iż z powodu wysokiego stopnia homologii białek z tej rodziny przeciwciała i limfocyty T skierowane przeciwko Hsp60 i Hsp65 *C. pneumoniae* reagują krzyżowo z ludzkim białkiem Hsp60 [8, 55, 65]. Jednak Jastrzębski i wsp. nie potwierdzili w swoich badaniach zależności pomiędzy zakażeniem *C. pneumoniae* a poziomem przeciwciał anty-Hsp60 u osób z chorobą niedokrwiennej serca. Wykazali oni, że mimo zwiększonej ekspresji białka Hsp60 u osób z nadciśnieniem tętniczym i wysokiego stopnia homologii pomiędzy strukturą ludzkiego i bakteryjnego białka Hsp60, reakcja immunologiczna przeciwko ludzkiemu Hsp60 nie miała związku z takimi zakażeniami [28, 29]. Jest wysoce prawdopodobne, że procesy zapalne zachodzące u pacjentów z chorobą wieńcową w śródbłonku naczyniowym mogą być nasilane przez przeciwciała anty-Hsp powstające w odpo-



Rys. 3. Hipoteza cytotoksycznego działania przeciwciał przeciwno białkom szoku cieplnego – Hsp60 wobec komórek śródbłonna naczyniowego (C – dopełniacz, MAC – kompleks atakujący błonę)

wiedzi na zakażenia *C. pneumoniae* [6, 29, 34], jakkolwiek już sama obecność *C. pneumoniae* w komórkach mięśni gładkich nasila ekspresję białka Hsp60, które może stać się tarczą dla przeciwciał, ale jest również jednym z bodźców stymulujących proliferację tych komórek [34].

W 1993 roku Xu i wsp. wskazali na korelację pomiędzy grubością warstwy wewnętrznej ściany tętnicy szyjnej a poziomem przeciwciał przeciwno białku Hsp65 mykobakterii [92]. Zwrócono również uwagę na związek pomiędzy wysokim poziomem przeciwciał anty-Hsp65 a śmiertelnością wśród pacjentów z chorobą wieńcową [89].

Choć hipoteza cytotoksycznego działania przeciwciał anty-Hsp60 i anty-Hsp65, wobec komórek śródbłonna naczyniowego została zasugerowana przez Ma y r'a i wsp. w 1999 roku [51], to już wcześniej wiele badań *in vitro* wskazało, że cząsteczki Hsp60 są ekspozowane na komórkach śródbłonna. Przeciwciała anty-Hsp60, tworząc z nimi kompleksy immunologiczne aktywują cytotoxycznosc zależną od dopełniacza, skutkiem czego jest uszkodzenie komórek śródbłonna [71, 76, 91], rys. 3. Jednakże nie wszystkie badania potwierdzają występowanie zjawiska cytotoxycznosci wobec komórek śródbłonna. Może to wskazywać na znaczenie podklasy przeciwciał, które reagują z wspólnym epitopem ludzkiego i bakteryjnego białka Hsp60 oraz możliwością aktywacji dopełniacza. Z badań A y a d y i wsp. wynika, że przeciwciała IgG2 przeciwno specyficznym peptydom białka

Hsp60 *H. pylori* (Glu¹⁴¹-Leu¹⁶⁰) rozpoznają sekwencje aminokwasowe w ludzkim białku Hsp60. W badaniach prowadzonych na myszach zespół ten potwierdził zależność pomiędzy podwyższonym poziomem przeciwciał IgG2a anty-Hsp60 *H. pylori* a nasileniem zmian miażdżycowych w śródbłonna [4].

Wykazano również wiązanie bakteryjnego białka Hsp60 z ludzkimi przeciwciałami IgG1, IgG3 i IgM, ale nie IgA, za pośrednictwem fragmentu Fab [10].

W badaniach własnych wykazano istotnie częstszą produkcję przeciwciał IgG anty-HspB *H. pylori* u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca zakażonych niż u osób niezakażonych tymi bakteriami. Takiej zależności nie zaobserwowano w odniesieniu do przeciwciał przeciwno ludzkiemu białku Hsp60, które wykrywano z podobną częstością zarówno u osób z wykluczonym, jak i z potwierdzonym zakażeniem *H. pylori* [49]. Wyniki badań O k a d y i wsp. wskazują, że u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca podwyższony jest zarówno poziom przeciwciał przeciwno ludzkiemu białku Hsp60, jak i przeciwno jego odpowiednikowi występującemu u pałeczek *H. pylori* [57]. Na podwyższony poziom przeciwciał przeciwno ludzkiemu białku Hsp60 w surowicach pacjentów z chorobą niedokrwienną serca wskazują również badania P r o h á s z k i i wsp. [64]. Natomiast Z h u i wsp. nie tylko potwierdzili obecność przeciwciał przeciwno białku Hsp60 u 75% pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, ale zwrócili także uwagę, iż przeciwciała takie

występowały istotnie częściej u osób seropozytywnych (65%) niż seronegatywnych (49%) [98].

Wykazano także, iż poziom IgG anty-Hsp60 był istotnie wyższy u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca zakażonych szczepami *H. pylori* typu I (CagA+VacA+), niż u osób z grupy kontrolnej zakażonych tym samym typem pałeczek *H. pylori*. Nie stwierdzono jednak różnicy istotnej statystycznie w poziomie IgG anty-Hsp60 porównując pacjentów z chorobą wieńcową z zakażeniem *H. pylori* typu I lub typu II (CagA-VacA-) oraz pacjentów niezakażonych tymi drobnoustrojami. Analizując intensywność produkcji przeciwciał anty-Hsp60 wśród osób bez zmian wieńcowych autorzy wykazali, że poziom takich przeciwciał był istotnie wyższy u osób zakażonych *H. pylori* niezależnie od typu szczepu wywołującego zakażenie, w porównaniu do osób zdrowych niezakażonych tymi pałeczkami [43].

Hoppichler i wsp. zwrócili uwagę na prognostyczną wartość oznaczania przeciwciał anty-Hsp60 i anty-Hsp65 u pacjentów z chorobą niedokrwienną. W pierwotnie utworzonej grupie doświadczalnej osób z podwyższonym mianem takich przeciwciał, stwierdzono występowanie epizodów sercowo-naczyniowych, pod postacią niestabilnej dławicy piersiowej, zawału serca, udaru mózgu, a nawet zgonu sercowego [25, 87]. Wykazano, iż zwłaszcza przeciwciała IgA skierowane przeciwko ludzkiemu białku Hsp60 mogą przyczyniać się do wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych [26]. Te spostrzeżenia po raz kolejny rzucają światło na rolę przeciwciał tej klasy w patogenezie choroby wieńcowej. U zdrowych ochotników wyższe stężenie takich przeciwciał oznaczano u dawców, u których stwierdzono nadciśnienie tętnicze lub cukrzycę. Wykazany przez innych badaczy spadek poziomu przeciwciał anty-Hsp60 u pacjentów poddanych leczeniu aspiryną i/lub statynami wydaje się potwierdzać, iż przeciwciała anty-Hsp pojawiają się u pacjentów z aktywną chorobą wieńcową [96].

Obecnie wiele uwagi poświęca się ustaleniu potencjalnego mechanizmu działania przeciwciał przeciwko bakteryjnym białkom Hsp w chorobie niedokrwienną serca.

Krzyżowe wiązanie białka HspB *H. pylori* przez przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiemu białku Hsp60 wykazali Kawahara i wsp. [32], a Okada i wsp. potwierdzili, że przeciwciała IgG przeciwko określonym sekwencjom aminokwasowym białka Hsp60 *H. pylori* rozpoznawały determinanty antygenowe ludzkiego białka Hsp60 w teście ELISA. Wiadomo, iż dwudziesto aminokwasowy fragment tego białka (Glu¹⁴¹-Leu¹⁶⁰) jest dominującym epitopem związanym z patogenezą choroby wieńcowej [57].

Występowanie pewnych determinantów antygenowych wspólnych dla ludzkiego Hsp60 i Hsp65 *Mycobacterium tuberculosis* stwierdzono także w cząsteczce

ludzkiego białka CRP. Wspólne determinanty zlokalizowane we wszystkich tych białkach były rozpoznawane przez IgG anty-CRP [83].

Pershin i wsp. wykazali, że przeciwciała przeciwko białkom Hsp65 *M. tuberculosis* oraz *Escherichia coli* rozpoznawały 17 epitopów, natomiast przeciwciała anty-Hsp60 *Chlamydia trachomatis* reagowały z 18 epitopami ludzkiego Hsp60. Wykazano, że 8 epitopów ludzkiego białka Hsp60 było rozpoznawanych przez wszystkie oceniane przeciwciała przeciwko bakteryjnym białkom Hsp60. W badaniach histochemicznych wykazano, że niektóre z tych epitopów są ekspozowane w komórkach śródbłonna ścian naczyń krwionośnych [62].

Aktywność przeciwciał, indukowanych przez bakteryjne białka Hsp, może być błędnie kierowana przeciwko ludzkiemu białku Hsp60, którego ekspresja nasila się w śródbłonku naczyniowym w przebiegu choroby niedokrwienną serca.

Niektórzy badacze sugerują, iż ocena wytwarzania przeciwciał anty-Hsp60 może stanowić dodatkowy marker pomocny w diagnozowaniu choroby wieńcowej [57]. Varbiri i wsp. badając stabilność przeciwciał IgG anty-Hsp60 u pacjentów z chorobą wieńcową nie wykazali zmian w poziomie takich immunoglobulin w ciągu pięciu lat, co świadczy o wysokiej stabilności przeciwciał skierowanych przeciwko konserwatywnym białkom szoku cieplnego [86].

W pracy przeglądowej dotyczącej związku białek szoku cieplnego z chlamydiozami i chlamydofilozami Pawlikowska i Deptuła zwracają uwagę na wartość diagnostyczną oznaczania poziomu przeciwciał przeciwko białkom Hsp *C. pneumoniae* w chorobach układu krążenia, z towarzyszącym zakażeniem *C. pneumoniae*, ze względu na możliwe interakcje takich przeciwciał z ludzkim białkiem Hsp60 ekspozowanym na makrofagach. Autorzy podkreślają, iż konsekwencją takiej interakcji może być aktywacja makrofagów skutkująca wytwarzaniem cytokin nasilających przebieg reakcji zapalnej, która odgrywa kluczową rolę w patogenezie choroby niedokrwienną serca [60].

Z kolei Kimura i wsp. na podstawie przeprowadzonych oznaczeń poziomu przeciwciał anty-Hsp60 w surowicach i analizy stanu istoty białej mózgu zasugerowali, że podwyższony poziom takich przeciwciał może stanowić czynnik ryzyka dla choroby małych naczyń krwionośnych w mózgu [35].

9. Podsumowanie

W ostatnich latach ubiegłego stulecia rozpoczęto badania nad rolą procesu zapalnego w rozwoju miażdżycy. Zwrócono także uwagę na udział czynników zakaźnych, m.in. *C. pneumoniae* i *H. pylori* w patogenezie choroby niedokrwienną serca, a także na rolę pro-

cesów autoimmunologicznych. Mimo licznych badań nie ma ostatecznej odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób zakażenia mogą wpływać na powstawanie i rozwój blaszki miażdżycowej. Przedstawione wyniki badań wydają się potwierdzać hipotezę o roli bakteryjnych białek Hsp, jako czynników stymulujących reakcje autoimmunologiczne i wynikające z nich procesy patologiczne w chorobie niedokrwiennej serca. Rola tych białek w procesie miażdżycowym jest prawdopodobnie powiązana z podwyższonym mianem przeciwciał anti-Hsp, które mogą być indukowane przez bakteryjne powierzchniowe białka szoku cieplnego, o wysokim stopniu podobieństwa do białek gospodarza ekspozowanych w komórkach śródbłonna naczyniowego. Powstawanie kompleksów immunologicznych, w skład których wchodzi białka Hsp i przeciwciała anti-Hsp może być przyczyną uszkodzenia naczyń wskutek cytotoxyczności zależnej od białek dopełniacza. To pociąga za sobą nasilenie procesów zapalnych i ich utrwalenie.

Piśmiennictwo

- Ameriso S.E., Fridman E.A., Leiguarda R.C., Sevlever G.E.: Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*, **32**, 385–391 (2001)
- Andersen P.: Pathogenesis of lower respiratory tract infections due to *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Legionella* and viruses. *Thorax*, **53**, 302–307 (1998)
- Andrié R.P., Bauriedel G., Braun P., Höpp H.W., Nickenig G., Skowasch D.: Prevalence of intimal heat shock protein 60 homologues in unstable angina and correlation with anti-heat shock protein antibody titers. *Basic. Res. Cardiol.* **106**, 657–665 (2011)
- Ayada K., Yokota K., Kobayashi K., Shoenfeld Y., Matsuura E., Oguma K.: Chronic infections and atherosclerosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **37**, 44–48 (2009)
- Benjamin I.J., McMillan D.R.: Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **83**, 117–132 (1998)
- Bryczyński M., Wiechowski S., Naruszewicz M.: *Chlamydia pneumoniae* w progresji wielonaczyniowej choroby wieńcowej. *Terapia*, **112**, 20–24 (2001)
- Choroszy-Król I., Ruczkowska J.: Laboratoryjna diagnostyka chlamydioz. Akademia Medyczna we Wrocławiu, 2004, s. 53–57
- Ciervo A., Visca P., Petrucca A., Biasucci L.M., Maseri A., Cassone A.: Antibodies to 60-kilodalton heat shock protein and outer membrane protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary heart disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 66–74 (2002)
- Danesh J., Collins R., Peto R.: Chronic infection and coronary heart disease: is there any link? *Lancet*, **350**, 430–436 (1997)
- Dubreuil J.D., Giudice G.D., Rappuoli R.: *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 617–629 (2002)
- Dunzendorfer S., Lee H., Soldau K., Tobias P.S.: Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS-responses. *FASEB J.* **18**, 1117–1119 (2004)
- Edfeldt K., Bennet A.M., Eriksson P., Frostegard J., Wiman B., Hamsten A., Hansson G.K., de Faire U., Yan Z.Q.: Association of hypo-responsive Toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **25**, 1447–1453 (2004)
- Filipiak K.J., Opolski G.: Choroby układu sercowo-naczyniowego i ich czynniki ryzyka – teoria continuum. *Terapia*, **9**, 5–9 (2001)
- Franceschi F., Sepulveda A.R., Gasbarrini A., Pola P., Silveri N.G., Gasbarrini G., Graham D.Y., Genta R.M.: Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens: possible pathogenic link between *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis. *Circulation*, **106**, 430–434 (2002)
- Fryer R.H., Schwobe E.P., Woods M.L., Rodgers G.M.: *Chlamydia* species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J. Invest. Med.* **45**, 168–174 (1997)
- Galustian Ch., Elviss N., Chart H., Owen R., Feizi T.: Interactions of gastrotropic bacterium *Helicobacter pylori* with the leukocyte-endothelium adhesion molecules, the selectins – a preliminary report. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **36**, 127–134 (2003)
- Grębczewska Z., Nartowicz E., Szymaniak L., Wiśniewska E., Przybył R., Polak G., Kubica J., Dymek G., Giedrys-Kalemba G., Kotschy M., Odrowąż-Sypniewska G.: Endothelial dysfunction in acute coronary syndrome without ST segment elevation in the presence of *Helicobacter pylori* infection. *Kardiol. Pol.* **57**, 533–536, (2002)
- Grębowska A., Moran A.P., Bielański W., Matusiak A., Rechciński T., Rudnicka K., Baranowska A., Rudnicka W., Chmiela M.: *Helicobacter pylori* lipopolisaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocyte cultures. *J. Physiol. Pharmacol.* **61**, 437–442 (2010)
- Grębowska A., Moran A.P., Matusiak A., Bąk-Romaniszyn L., Czkwianianc E., Rechciński T., Walencka M., Płaneta-Małecka I., Rudnicka W., Chmiela M.: Anti-phagocytic activity of *Helicobacter pylori* lipopolisaccharide (LPS) – possible modulation of the innate immune response to these bacteria. *Pol. J. Microbiol.* **57**, 185–192 (2008)
- Hajra L., Evans A.I., Chen M., Hyduk S.J., Collins T., Cybylsky M.I.: The NF- κ B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9052–9057 (2000)
- Halme S., Latvala J., Karttunen R., Palatsi I., Saikku P., Surcel H.M.: Cell-mediated immune response during primary *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* **68**, 7156–7158 (2000)
- Hasan A., Sadoh D., Palmer R., Foo M., Marber M., Lehner T.: The immune responses to human and microbial heat shock proteins in periodontal disease with and without coronary heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* **142**, 585–594 (2005)
- He M.A., Zhang X., Wang J., Cheng L., Zhou L., Zeng H., Wang F., Chen Y., Xu Z., Wei Q., Hu F.B., Wu T.: Genetic variation in heat shock protein 60 gene and coronary heart disease in China: tagging-SNP haplotype analysis in a case-control study. *Cell. Stress Chaperones*, **13**, 231–238 (2008)
- Heneghan M.A., McCarthy C.F., Moran A.P.: Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. *Infect. Immun.* **68**, 937–941 (2000)
- Hoppichler F., Koch T., Dzien A., Gschwandtner G., Lechleitner M.: Prognostic value of antibody titre to heat-shock protein 65 on cardiovascular events. *Cardiology*, **94**, 220–223 (2000)
- Huittinen T., Leinonen M., Tenkanen L., Mänttari M., Virkkunen H., Pitkänen T., Wahlström E., Palosuo T., Manninen V., Saikku P.: Autoimmunity to human heat shock protein 60, *Chlamydia pneumoniae* infection, and inflammation in predicting coronary risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 431–437 (2002)

27. Jama-Kmiecik A., Choroszy-Król I.: Rola *Chlamydomphila pneumoniae* w astmie oskrzelowej i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc – mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. *Adv. Clin. Exp. Med.* **16**, 113–121 (2007)
28. Jastrzębski M., Czarnecka D., Rajzer M., Kawecka-Jaszcz K.: Increased levels of inflammatory markers in hypertensives with target organ damage. *Kardiolog. Pol.* **64**, 802–811 (2006)
29. Jastrzębski M., Czarnecka D., Rajzer M., Marcinkowski M., Kawecka-Jaszcz K.: Infekcja *Chlamydia pneumoniae* oraz wirusem cytomegalii a przebudowa naczyń i serca w samoistnym nadciśnieniu tętniczym. *Nadciśnienie Tętnicze*, **9**, 266–275 (2005)
30. Jawień J.: New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **118**, 127–131 (2008)
31. Józefowicz-Okonkwo G., Wierzbowska-Drabik K., Kasielski M., Trzos E., Goraca A., Nowak D., Kasprzak J., Krzemińska-Pakuła M.: Is Hsp27 a marker of myocardial ischaemia? *Kardiolog. Pol.* **67**, 947–952 (2009)
32. Kawahara Y., Yokota K., Mizuno M., Yunoki N., Uesu T., Okada H., Kobayashi K., Hirai Y., Oguma K., Tsuji T.: Antibodies to human gastric epithelial cells and heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Gut*, **45**, 20–23 (1999)
33. Kaźmierczuk A., Kiliańska Z.M.: Plejotropowa aktywność białek szoku cieplnego. *Post. Hig. Med. Dosw.* **63**, 502–521 (2009)
34. Kern J.M., Maass V., Maass M.: *Chlamydia pneumoniae*-induced pathological signaling in the vasculature. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **55**, 131–139 (2009)
35. Kimura A., Sakurai T., Yamada M., Koumura A., Hayashi Y., Tanaka Y., Hozumi I., Takemura M., Seishima M., Inuzuka T.: Elevated Anti-Heat Shock Protein 60 Antibody Titer is Related to White Matter Hyperintensities. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **21**, 305–309 (2012)
36. Kol A., Lichtman A.H., Finberg R.W., Libby P., Kurt-Jones E.A.: Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.* **164**, 13–17 (2000)
37. Kowalski M., Konturek P.C., Pieniazek P., Karczewska E., Kluczka A., Grove R., Krakig W., Nasseri R., Thale J., Hahn E.G., Konturek S.J.: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary lumen reduction after percutaneous coronary angioplasty. *Dig. Liver Dis.* **33**, 222–229 (2001)
38. Krenke R.: Zakażenia górnych dróg oddechowych – wywołane przez drobnoustroje atypowe. *Magazyn Otorynolaryngologiczny*, **XII** (wydanie specjalne), 3–15 (2006)
39. Kuch M.: Białka szoku cieplnego – czy mamy już do czynienia z nowym markerem niedokrwienia? *Kardiolog. Pol.* **67**, 953–954 (2009)
40. Kutuk O., Basaga H.: Inflammation meets oxidation: NF-κB as mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol. Med.* **9**, 549–557 (2003)
41. Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C.: Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 743–761 (2008)
42. Laurila A., Bloigu A., Nayha S., Hassi J., Leinonen M., Saikku P.: Association of *Helicobacter pylori* infection with elevated serum lipids. *Atherosclerosis*, **142**, 207–210 (1999)
43. Lenzi C., Palazzuoli A., Giordano N., Alegente G., Gonnelli C., Campagna M.S., Santucci A., Sozzi M., Papakostas P., Rollo F., Nuti R., Figura N.: *H. pylori* infection and systemic antibodies to CagA and heat shock protein 60 in patients with coronary heart disease. *World J. Gastroenterol.* **12**, 7815–7820 (2006)
44. Liao K.W., Lin C.S., Chen W.L., Yang C.T., Lin C.M., Hsu W.T., Lin Y.Y., Chiu Y.H., Huang K.C., Wu H.Y., Wu M.S., Wu C.J., Mao S.J., Tsai N.M. Antibodies against *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 aggravate HSP60-mediated proinflammatory responses. *Cytokine*, **55**, 174–180 (2011)
45. Malferteiner P. *Helicobacter pylori* – od podstaw do leczenia. Wyd. Medyczne Sanmedica, Warszawa, 1997, s. 11–32
46. Mallat Z., Tedgui A.: Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ. Res.* **88**, 998–1003 (2001)
47. Marshall B.J., Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**, 1311–1315 (1984)
48. Matsuura E., Kobayashi K., Matsunami Y., Shen L., Quan N., Makarova M., Suchkov S.V., Ayada K., Oguma K., Lopez L.R.: Autoimmunity, infectious immunity and atherosclerosis. *J. Clin. Immunol.* **29**, 714–721 (2009)
49. Matusiak A., Rechciński T., Rudnicka K., Bąk-Romaniszyn L., Czkwianianc E., Rudnicka W., Krzemińska-Pakuła M., Chmiela M.: The reactivity of serum IgG from the patient with coronary heart disease and healthy subjects with heat shock proteins (Hsp): HspB of *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium bovis* Hsp65 and human recombinant Hsp60. Wyd. SGGW, Warszawa, 2009, s. 116–119
50. Matusiak A., Rechciński T., Rudnicka K., Walencka M., Rudnicka W., Chmiela M.: *Helicobacter pylori* and *Chlamydomphila pneumoniae* infections – potential risk factors for the development of coronary heart disease. *Sepsis*, **4**, 221–227 (2010)
51. Mayr M., Metzler B., Kiechl S., Willeit J., Schett G., Xu Q., Wick G.: Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*. Immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation*, **99**, 1560–1566 (1999)
52. Mehta T.A., Greenman J., Etelelaie C., Venkatasubramaniam A., Chetter I.C., McCollum P.T.: Heat shock proteins in vascular disease- a review. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **29**, 395–402 (2005)
53. Mendall M.A., Goggin P.M., Molliniaux N., Srahan D., Camm A.: Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Heart. J.* **71**, 437–439 (1994)
54. Milioti N., Bermudez-Fajardo A., Penichet M.L., Oviedo-Orta E.: Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin. Dev. Immunol.* ID 723539 (2008)
55. Moen R.J., La Voi K.P., Zhang M., Blake M.J.: Clonidine-Induced Heat-Shock Protein Expression in Rat Aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **3**, 171–184 (1998)
56. Niemiela S., Karttunen T., Korhonen T., Laara E., Karttunen R., Ikaheimo M., Kesaniemi Y.A.: Could *Helicobacter pylori* infection increase the risk of coronary heart disease by modifying serum lipid concentration? *Heart*, **75**, 573–575 (1996)
57. Okada T., Ayada K., Usui S., Yokota K., Cui J., Kawahara Y., Inaba T., Hirohata S., Mizuno M., Yamamoto D., Kusachi S., Matsuura E., Oguma K.: Antibodies against heat shock protein 60 derived from *Helicobacter pylori*: diagnostic implications in cardiovascular disease. *J. Autoimmun.* **29**, 106–115 (2007)
58. Ostos M.A. Recalde D., Zakin M.M. Scott-Ajgara D.: Implication of natural killer T cell in atherosclerosis development during a LPS-induced chronic inflammation. *FEBS Lett.* **519**, 23–29 (2002)
59. Pająk A.: Zwalczenie choroby niedokrwiennej serca poprzez modyfikację czynników ryzyka. *Acta Angiol.* **2**, 111–122 (1996)
60. Pawlikowska M., Deptuła W.: Białka szoku termicznego (HSPs – Heat Shock Proteins), a chlamydiozy i chlamydofiloz. *Post. Mikrobiol.* **48**, 213–219 (2009)
61. Pawlus J., Rusak M., Chociej-Stypułkowska J., Dąbrowska M.: Parametry aktywacji płytek krwi i stężenie mieloperoksydazy, jako markery choroby niedokrwiennej serca. *Pol. Merk. Lek.* **172**, 259–262 (2010)

62. Perschinka H., Mayr M., Millionig G., Mayerl C., van der Zee R., Morrison S.G., Morrison R.P., Xu Q., Wick G.: Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1060–1065 (2003)
63. Pockley A.G., Wu R., Lemne C., Kiessling R., de Faire U., Frostegård J.: Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension*, **36**, 303–307 (2000)
64. Prohászka Z., Duda J., Lakos G., Kiss E., Varga L., Jánoskúti L., Császár A., Karádi I., Nagy K., Singh M., Romics L., Füst G.: Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. *Int. Immunol.* **11**, 1363–1370 (1999)
65. Rabczyński M., Adamiec R.: Rola przewlekłego zakażenia i białek HSP60/65 w miażdżycy zarostowej. *Przegl. Lek.* **64**, 419–422 (2007)
66. Rabczyński M., Adamiec R., Olszewska-Rocznik J.: Przeciwciała anty-HSP 60/65 – rola w patogenezie miażdżycy, czynnik ryzyka rozwoju blaszki miażdżycowej. *Adv. Clin. Exp. Med.* **15**, 933–939 (2006)
67. Ridker P.M., Rifai N., Rose L., Buring J.E., Cook N.R.: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1557–1565 (2002)
68. Rudnicka K., Włodarczyk M., Moran A.P., Rechciński T., Miszczyk E., Matusiak A., Szczęsna E., Walencka M., Rudnicka W., Chmiela M.: *Helicobacter pylori* antigens as potential modulators of lymphocytes' cytotoxic activity. *Microbiol. Immunol.* **56**, 62–75 (2012)
69. Rywik S., Broda G., Piotrowski W., Wągrowaska H., Polakowska M., Pardo B.: Epidemiologia chorób układu krążenia – Program Pol-MONICA Warszawa, *Kardiol. Pol.* **44** (supl. II), 7–35 (1995)
70. Saikku P., Leinonen M., Mattila K., Ekman M.R., Nieminen M.S., Mäkelä P.H., Huttunen J.K., Valtonen V.: Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*, **2**, 983–986 (1988)
71. Schett G., Xu Q., Amberger A., Van der Zee R., Recheis H., Willeit J., Wick G.: Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **96**, 2569–2577 (1995)
72. Shamaei-Tousi A., Steptoe A., O'Donnell K., Palmén J., Stephens J. W., Hurel S.J., Marmot M., Homer K., D'Aiuto F., Coates A.R., Humphries S.E., Henderson B.: Plasma heat shock protein 60 and cardiovascular disease risk: the role of psychosocial, genetic, and biological factors. *Cell Stress Chaperones*, **12**, 384–392 (2007)
73. Sheikine Y., Hansson G.K.: Chemokines and atherosclerosis. *Ann. Med.* **36**, 98–118 (2004)
74. Smith S.C., Greenland Ph., Grundy S.M.: Prevention Conference V. Beyond Secondary Prevention: Identifying the High-Risk Patient for primary prevention. Executive Summary. *Circulation*, **4**, 111–115 (2000)
75. Snoeckx L.H., Cornelussen R.N., Van Nieuwenhoven F.A., Reneman R.S., Van Der Vusse G.J.: Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev.* **81**, 1461–1497 (2001)
76. Soltys B.J., Gupta R.S.: Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell. Biol. Int.* **21**, 315–320 (1997)
77. Strapagiel D., Grębowska A., Różalska B., Bąk-Romaniszyn L., Czkwianian E., Płaneta-Małecka I., Rechciński T., Rudnicka W., Chmiela M.: Natural mannose-binding lectin (MBL) down-regulates phagocytosis of *Helicobacter pylori*. *Pol. J. Microbiol.* **55**, 95–101 (2006)
78. Svanholm C., Bandholtz L., Castanos-Velez E., Wigzell H.: Protective DNA immunization against *Chlamydia pneumoniae*. *Scand. J. Immunol.* **51**, 345–353 (2000)
79. Szostak W.B., Cybulska B.: Otyłość wisceralna jako czynnik miażdżycy. *Medycyna po Dyplomie*, wyd. specjalne, 2–8 (1996)
80. Thom D.H., Grayston J.T., Siscovick D.S., Wang S.P., Weiss N.S., Daling J.R.: Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA*, **268**, 68–72 (1992)
81. Tsan M.F., Gao B.: Heat shock protein and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **1**, 274–279 (2004)
82. Tukaj S., Lipińska B.: Białka szoku termicznego w reumatoidalnym zapaleniu stawów: przyjaciel czy wróg? *Post. Hig. Med. Dosw.* **65**, 427–436 (2011)
83. Udvarnoki K., Cervenak L., Uray K., Hudecz F., Kacsokovics I., Spallek R., Singh M., Füst G., Prohászka Z.: Antibodies against C-reactive protein cross-react with 60-kilodalton heat shock proteins. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 335–341 (2007)
84. Unkelbach K., Gardemann A., Kostrzewa M., Philipp M., Tillmanns H., Haberbosch W.: A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 932–938 (1999)
85. Vahdat K., Jafari S. M., Pazoki R., Nabipour I.: Concurrent increased high sensitivity C-reactive protein and chronic infections are associated with coronary artery disease: a population-based study. *Indian J. Med. Sci.* **61**, 124–126 (2007)
86. Varbiro S., Biro A., Cervenak J., Cervenak L., Singh M., Banhid F., Sebestyen A., Füst G., Prohászka Z.: Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies. *Acta Physiol. Hung.* **97**, 1–10 (2010)
87. Veres A., Füst G., Smieja M., McQueen M., Horváth A., Yi Q., Bíró A., Pogue J., Romics L., Karádi I., Singh M., Gnarp J., Prohászka Z., Yusuf S.: Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. Relationship of anti-60 kDa heat shock protein and anti-cholesterol antibodies to cardiovascular events. *Circulation*, **106**, 2775–2780 (2002)
88. Vreugdenhil A.C., Snoek A.M., van't Veer C., Greve J.W., Buurman W.A.: LPS – binding protein circulates an association with apoB – containing lipoproteins and enhances endotoxin – LDL-VLDL interaction. *J. Clin. Invest.* **107**, 225–234 (2001)
89. Xu Q., Kiechl S., Mayr M., Metzler B., Egger G., Oberhollenzer F., Willeit J., Wick G.: Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation*, **100**, 1169–1174 (1999)
90. Xu Q., Schett G., Perschinka H., Mayr M., Egger G., Oberhollenzer F., Willeit J., Kiechl S., Wick G.: Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation*, **102**, 14–20 (2000)
91. Xu Q., Schett G., Seitz C. S., Hu Y., Gupta R. S., Wick G.: Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. *Circ. Res.* **75**, 1078–1085 (1994)
92. Xu Q., Willeit J., Marosi M., Kleindienst R., Oberhollenzer F., Kiechl S., Stulnig T., Luef G., Wick G.: Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*, **341**, 255–259 (1993)
93. Xu X.H., Shah P.K., Faure E., Equils O., Thomas L., Fishbein M.C., Luthinger D., Xu X.P., Rajavashisth T.B., Yano J., Kaul S., Arditi M.: Toll-like receptor-4 is expressed by mac-

- rophages in Marine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, **104**, 3103–3108 (2001)
94. Ząbek J.: Rola antygenów bakteryjnych w indukcji procesów autoimmunizacyjnych związanych z patogenezą reaktywnego zapalenia stawów. *Alergia Astma Immunologia*, **4**, 41–44 (1999)
95. Zhang W.L., Gao X.Q., Han J.X., Wang G.Q., Yue L.T.: Expressions of heat shock protein (HSP) family HSP 60, 70 and 90alpha in colorectal cancer tissues and their correlations to pathohistological characteristics. *Ai Zheng*, **28**, 612–618 (2009)
96. Zhang X., He M.A., Cheng L., Zhou L., Zeng H., Wang J., Wang F., Chen Y., Hu F.B., Wu T.: Joint effects of antibody to heat shock protein 60, hypertension, and diabetes on risk of coronary heart disease in Chinese. *Clin. Chem.* **54**, 1046–1052 (2008)
97. Zhang X., He M., Cheng L., Chen Y., Zhou L., Zeng H., Pockley A.G., Hu F.B., Wu T.: Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk of coronary heart disease in Chinese. *Circulation*, **118**, 2687–2693 (2008)
98. Zhu J., Quyyumi A.A., Rott D., Csako G., Wu H., Halcox J., Epstein S.E.: Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation*, **103**, 1071–1075 (2001)

OPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZINY *ENTEROBACTERIACEAE* NA ANTYBIOTYKI β -LAKTAMOWE WYNIKAJĄCA Z WYTWARZANIA β -LAKTAMAZ

Ewa Nikonorow¹, Anna Baraniak^{1*}, Marek Gniadkowski¹

¹Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe. 3. Klasyfikacja β -laktamaz. 4. β -Laktamazy gatunkowo-specyficzne. 5. β -Laktamazy nabyte. 6. Ekspresja β -laktamaz. 7. Najważniejsze grupy β -laktamaz nabytych. 7.1. β -Laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL. 7.2. Cefalosporynazy AmpC. 7.3. Karbapenemazy. 7.3.1. Karbapenemazy klasy A. 7.3.2. Karbapenemazy klasy B. 7.3.3. Karbapenemazy klasy D. 8. Podsumowanie

β -Lactamase-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*

Abstract: Production is β -Lactamase the major mechanism of resistance to β -lactams in Gram-negative bacteria. In recent years, resistance due to production of β -lactamases has been increasing at an alarming rate. It refers mostly to extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) that are the main problem in microorganisms of the family *Enterobacteriaceae*, conferring resistance to all penicillins, cephalosporins (except for cephamycins) and monobactams. Acquired cephalosporinases of the AmpC type also have become a significant factor of enterobacterial resistance to newer generation of β -lactams. The effect of AmpCs is largely strengthened by this mutational overexpression in such pathogens as *Enterobacter* spp. or *Citrobacter freundii*. β -Lactamase-mediated resistance to carbapenems in the members of the family *Enterobacteriaceae* has become a matter of highest concern over the last decade. It has been associated with various carbapenem-hydrolyzing enzymes, including the so-called KPC, MBL or OXA-48 types. Antimicrobial resistance in bacteria has been a key issue in public health, requiring constant monitoring at the hospital, country and global level.

Contents: 1. Introduction. 2. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 3. Classification of β -lactamases. 4. Natural β -lactamases. 5. Acquired β -lactamases. 6. Expression of β -lactamases. 7. Main groups of the acquired β -lactamases. 7.1. Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs. 7.2. AmpC-type cephalosporinases. 7.3. Carbapenemases. 7.3.1. Class A carbapenemases. 7.3.2. Class B carbapenemases. 7.3.3. Class D carbapenemases. 8. Conclusions

Słowa kluczowe: AmpC, β -laktamaza, *Enterobacteriaceae*, ESBL, karbapenemaza

Key words: AmpC, β -lactamase, carbapenemase, *Enterobacteriaceae*, ESBL

1. Wprowadzenie

Szybki wzrost oporności bakterii na antybiotyki stosowane w leczeniu stanowi jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny. Oporność bakterii może być naturalna (charakterystyczna dla danego gatunku) lub nabyta (charakterystyczna dla danego szczepu drobnoustroju) i jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami. Oporność naturalna może wynikać z braku w komórkach danego gatunku miejsca docelowego dla leku, obecności struktur ograniczających możliwość jego dotarcia do celu lub funkcjonowania konkretnych mechanizmów oporności, których efektery (np. pompy, enzymy) kodowane są przez gatunkowo-specyficzne geny chromosomalne. Nie stanowi ona poważnego problemu klinicznego, gdyż zazwyczaj dotyczy jedynie niewielkich stężeń leków. Problem wzrasta, gdy dzięki zjawiskom genetycznym dochodzi np. do podwyższenia poziomu ekspresji naturalnych genów oporności i powstania szczepów opornych na leczenie, przy czym wówczas mamy już do czynienia z opornością nabytą. Ten rodzaj oporności stanowi znacznie większe wyzwanie. Zmiany w chromosomalnym DNA komórki,

oprócz podwyższenia ekspresji naturalnych genów oporności, mogą prowadzić też do modyfikacji miejsca docelowego antybiotyku lub zamknięcia dróg jego penetracji. Ponadto, efektywny horyzontalny transfer genów powoduje pojawianie się w komórkach nowych genów oporności (kodujących różnorodne efektery), przenoszonych na ruchomych elementach genetycznych (elementy transpozycyjne, plazmidy, bakteriofagi). Szczepy dysponujące opornością nabytą mają przewagę selekcyjną w warunkach silnej presji antybiotykowej. Równoczesna ekspozycja na różne rodzaje antybiotyków prowadzi do selekcji tzw. szczepów wieloopornych, czyli dysponujących opornością na kilka grup terapeutycznych. Jednoczesna obecność różnych genów oporności na tych samych elementach ruchomych ułatwia pojawianie się takich szczepów [39, 43, 76, 78].

Istnieje pięć podstawowych strategii oporności bakterii na antybiotyki, takich jak:

1. inaktywacja enzymatyczna antybiotyków (hydrolyza, modyfikacje chemiczne, np. acetylacja);
2. zmiany strukturalne miejsca działania leku (zmiany sekwencji aminokwasowej białka, modyfikacje, np. metylacja);

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; tel.: 22 851 43 88; fax: 22 841 33 67; e-mail: abaraniak@cls.edu.pl

3. zastąpienie oryginalnego miejsca docelowego nową cząsteczką, pozbawioną powinowactwa do leku;
4. zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych dla antybiotyku (błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych);
5. aktywne wypompowywanie leku z komórki [43, 76, 78].

2. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe

Antybiotyki β -laktamowe są największą i najbardziej zróżnicowaną grupą antybiotyków, używaną do leczenia niemal wszystkich rodzajów zakażeń o rozległej etiologii. W użyciu jest obecnie pięć typów β -laktamów, tj. penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy oraz inhibitory β -laktamaz, przy czym te ostatnie nie są antybiotykami i stosowane są w lekach łączonych z penicylinami lub cefalosporynami. Mechanizm działania β -laktamów polega na inhibicji kluczowych enzymów biosyntezy ściany komórkowej bakterii (peptydoglikanu), tzw. białek PBP (*Penicillin-Binding Proteins*). Komórki bakterii o osłabionej strukturze ściany ulegają lizie, przez co β -laktamy zaliczane są do antybiotyków o działaniu bakteriobójczym [39, 43]. Oporność bakterii na β -laktamy jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami, które klasyfikuje się w obrębie czterech zasadniczych strategii:

1. wytwarzanie białek PBP o niskim powinowactwie do β -laktamów;
2. zmniejszanie przepuszczalności osłon komórkowych bakterii;
3. wypompowywanie leków z komórki bakteryjnej;
4. wytwarzanie β -laktamaz – enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów.

Pierwsza grupa mechanizmów, obecna zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, związana jest z białkami PBP. Mechanizmy oporności zależne od tych białek są dwójakiego rodzaju. Pierwszy polega na modyfikacji naturalnych PBP tak, aby nie miały one powinowactwa do β -laktamów, ale jednocześnie pełniły funkcje katalityczne w procesie wytwarzania peptydoglikanu. Modyfikacje te następują wskutek gromadzenia mutacji w genach *pbp* lub nabywania ich zmutowanych fragmentów od innych organizmów i zastępowania nimi homologicznych odcinków genów własnych. Drugi rodzaj związany jest z pozyskiwaniem obcego, kompletnego genu kodującego białko PBP, które nie oddziałuje z cząsteczkami β -laktamów [43].

Dwie kolejne strategie, typowe dla bakterii Gram-ujemnych, polegają na ograniczeniu możliwości penetracji komórki bakteryjnej przez antybiotyk β -laktamowy. Pierwsza z nich związana jest z likwidacją lub zmniejszeniem liczby tzw. kanałów porynowych

w błonie zewnętrznej tych bakterii, przez co cząsteczki β -laktamów wnikają w niższych stężeniach do przestrzeni periplazmatycznej komórki. Druga strategia polega na aktywnym wypompowywaniu leku z komórki bakteryjnej, która może ulegać intensyfikacji wskutek podwyższania ekspresji tzw. systemów pompowo-porynowych, odpowiedzialnych za ten proces [43, 51].

Ostatnim z omawianych typów mechanizmów, o największym znaczeniu dla oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek Gram-ujemnych, jest wytwarzanie β -laktamaz [44]. Enzymy te prawdopodobnie pochodzą od prekursorowych białek PBP; przypuszcza się, że niektóre z nich mogą nadal pełnić bliżej nieokreśloną rolę w procesie biosyntezy peptydoglikanu [49, 51]. Jednak podstawową funkcją β -laktamaz jest ochrona bakterii przed działaniem β -laktamów, zarówno tych, które są naturalnie produkowane i uwalniane do środowiska przez grzyby i inne bakterie (β -laktamazy naturalne), jak i tych, które stosowane są przez człowieka w medycynie i innych obszarach aktywności (β -laktamazy naturalne i nabyte) [39].

3. Klasyfikacja β -laktamaz

Zdecydowana większość β -laktamaz posiada serynę w centrum aktywnym (β -laktamazy serynowe), a katalizowana przez nie hydroliza β -laktamów przebiega dwuetapowo: najpierw w reakcji acylacji wytwarzany jest ester serynowy, a następnie w wyniku jego hydrolizy (deacylacji) uwolniony zostaje produkt bez pierścienia β -laktamowego [39, 49, 51]. Drugi, mniej powszechny mechanizm otwierania pierścienia β -laktamowego wykorzystywany jest przez tzw. metalo- β -laktamazy i opiera się na interakcji antybiotyku z kationem cynku w centrum aktywnym enzymu. Wytwarzanie β -laktamaz jest jednym z intensywniej i najdłużej badanych mechanizmów oporności bakterii na leki [9, 39].

Zasadniczy zrąb różnorodności β -laktamaz, obejmujący wszystkie znane dzisiaj ich klasy i rodziny powstał dawno przed wprowadzeniem do lecznictwa antybiotyków. Niezwykle krótki z ewolucyjnego punktu widzenia okres po wprowadzeniu antybiotyków do terapii i innych dziedzin aktywności człowieka zaowocował dalszym, bardzo przyspieszonym różnicowaniem się tych enzymów. Obecnie w użyciu są dwa systemy klasyfikacji β -laktamaz, tzw. system funkcjonalny oraz system strukturalny [2, 9, 11, 39]. Pierwszy, autorstwa Bush i Jacoby'ego, opiera się na porównaniu szybkości reakcji hydrolizy różnych β -laktamów (penicylin, cefalosporyn, monobaktamów i karbapenemów) oraz podatności β -laktamaz na inhibicję przez niektóre β -laktamy (typowe inhibitory β -laktamaz – kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam, a także aztreonam i kloksacylinę) oraz EDTA i NaCl. Wyodrębnia

on cztery zasadnicze grupy funkcjonalne, oznaczone cyframi od 1 do 4:

- Grupa 1 obejmuje β -laktamazy preferujące cefalosporyny, ale aktywne też względem penicylin i monobaktamów, słabo podatne na inhibicję kwasem klawulanowym, ale hamowane przez kloksacylinę. Tradycyjnie określa się je terminem „cefalosporynazy AmpC”.
- Grupa 2 jest najliczniejsza, bardzo zróżnicowana strukturalnie i funkcjonalnie, przez to podzielona na 12 podgrup. Są tu zarówno penicylinazy, jak i cefalosporynazy, o wąskim, szerokim, rozszerzonym lub ekstremalnie szerokim spektrum substratowym, obejmującym praktycznie wszystkie β -laktamy. Wspólną cechą tych enzymów jest podatność na hamowanie przez inhibitory β -laktamowe (kwas klawulanowy, tazobaktam, sulbaktam), która może też ulegać redukcji w drodze mutacji.
- Grupa 3 obejmuje metalo- β -laktamazy (MBL), hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny oraz karbapenemy. MBL są hamowane przez EDTA, natomiast nie są hamowane przez inhibitory β -laktamowe.
- Grupa 4 to zaledwie kilka enzymów stosunkowo dawno zidentyfikowanych i słabo zbadanych; w najnowszej wersji systemu klasyfikacji funkcjonalnej grupa ta została pominięta [39].

Drugi system zaproponował Ambley [1]. Jest on oparty na analizie sekwencji aminokwasowych enzy-

mów i grupuje β -laktamazy ze względu na ich pokrewieństwo ewolucyjne. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych β -laktamaz pozwoliła wyróżnić cztery klasy enzymów, oznaczone od A do D. Klasy A, C i D to β -laktamazy serynowe, natomiast w klasie B znalazły się MBL. Oba podziały β -laktamaz dobrze ze sobą korelują. Wszystkie enzymy tworzące funkcjonalną grupę 1 stanowią strukturalną klasę C. Grupa 2 zawiera β -laktamazy klas A i D, natomiast grupa 3 odpowiada klasie B. Enzymy należące do funkcjonalnej grupy 4 nie zostały scharakteryzowane pod względem struktury.

4. β -Laktamazy gatunkowo-specyficzne

Jak wspomniano wcześniej, β -laktamazy pojawiły się na wczesnych etapach ewolucji bakterii. Wspólnymi przodkami dzisiejszych β -laktamaz oraz białek PBP były pierwotne PBP. W 1998 r. Massova i Mobasher zaproponowali hipotezę, w myśl której wszystkie klasy β -laktamaz (A-D) wyewoluowały niezależnie od siebie z innych prekursorów PBP, wraz z odpowiednimi klasami współczesnych białek PBP [49]. Zdecydowana większość pałeczek Gram-ujemnych posiada własne, typowe dla danego gatunku β -laktamazy, których geny zlokalizowane są w chromosomalnym DNA. Wiele gatunków bakterii Gram-ujemnych, m.in. *Acinetobacter* spp.,

Tabela I

Wybrane elementy klasyfikacji funkcjonalnej i strukturalnej β -laktamaz (na podstawie Jacoby i Bush [32])

Grupa funkcjonalna	Klasa strukturalna	Wybrane substraty	Wrażliwość na inhibitory		Wybrane enzymy			
			klawulanian tazobaktam	EDTA				
1	1	C	cefalosporyny (I, II, III)*	NIE	NIE	Cefalosporynazy AmpC <i>E. coli</i> i <i>P. aeruginosa</i> , CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99		
			cefalosporyny (I, II, III, IV)	NIE	NIE	GCI, CMY-37		
2	2a	A	penicyliny z wyjątkiem izoksazolilowych	TAK	NIE	PCI		
			penicyliny i cefalosporyny (I)	TAK	NIE	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)		
			penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), monobaktamy	TAK	NIE	CTX-M-15, CTX-M-44 (TOHO-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1		
			penicyliny i cefalosporyny (I)	NIE	NIE	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26		
			penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV) i monobaktamy	NIE	NIE	TEM-50, TEM-68, TEM-89		
			karboksypenicyliny	TAK	NIE	PSE-1, CARB-3		
			2d	D	penicyliny izoksazolilowe	Słaba	NIE	OXA-1, OXA-10
					penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV)	Słaba	NIE	OXA-II, OXA-15
					penicyliny, karbapenemy	Słaba	NIE	OXA-23, OXA-48
			2e	A	cefalosporyny (I, II, III, IV)	TAK	NIE	CepA
karbapenemy	TAK	NIE			IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-1			
3	3a	B	penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), karbapenemy	NIE	TAK	IMP-1, LI, NDM-1, VIM-1		
			karbapenemy	NIE	TAK	CphA, Sfh-1		

* liczbami rzymskimi oznaczono generacje cefalosporyn

Pseudomonas spp. oraz pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, takie jak *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* i *Providencia rettgeri*, posiada gatunkowo-specyficzne cefalosporynazy AmpC. Pomimo pewnych różnic gatunkowych, enzymy te charakteryzują się bardzo szerokim zakresem preferencji substratowych, obejmującym przede wszystkim większość cefalosporyn (z wyjątkiem leków IV generacji), ale też penicyliny i monobaktamy [10, 39, 43, 51]. Ekspresja tych β -laktamaz najczęściej ma charakter indukowalny, ale u *E. coli* i *Acinetobacter* spp. zachodzi ona konstytutywnie na bardzo niskim poziomie i nie nadaje dzikim szczepom oporności na antybiotyki β -laktamowe [39, 43]. Różne zjawiska genetyczne (mutacje w genach regulatorowych, mutacje i insercje elementów ruchomych w obrębie promotorów) prowadzą do ekspresji konstytutywnej enzymów AmpC na zdecydowanie podwyższonym poziomie.

Niektóre pałeczki Gram-ujemne: *Klebsiella* spp., *Citrobacter koseri*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Kluyvera* spp., *Chryseobacterium meningosepticum*, *Stenotrophomonas maltophilia* i inne wytwarzają charakterystyczne enzymy należące do klasy A. Profile substratowe tych β -laktamaz są bardzo zróżnicowane. Niektóre z nich głównie hydrolizują różnego rodzaju penicyliny i są to tzw. β -laktamazy o szerokim spektrum substratowym (np. enzymy typu SHV-1, LEN lub OKP *Klebsiella pneumoniae*), a inne posiadają bardzo rozległy zakres działania tzw. β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL (np. β -laktamazy K-OXY *Klebsiella oxytoca* lub KLU *Kluyvera* spp.), lub do nich zbliżony [39, 43]. U szeregu wymienionych gatunków naturalny poziom wytwarzania tych enzymów jest bardzo niski i nie nadają one drobnoustrojom oporności na β -laktamy. Podobnie jednak jak w przypadku naturalnych cefalosporyn AmpC, możliwe są modyfikacje genetyczne, prowadzące do istotnego podwyższenia ich ekspresji. U niektórych gatunków naturalne β -laktamazy klasy A wytwarzane są w sposób indukowalny [39].

Inną grupę enzymów kodowanych chromosomalnie stanowią MBL. Występują one np. u *S. maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *C. meningosepticum*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus*, *Janthinobacterium lividum*, czy *Flavobacterium johnsoniae*, i wykazują aktywność wobec penicylin, cefalosporyn i karbapenemów, przez co ich spektrum substratowe należy także określić jako bardzo szerokie [10, 43].

5. β -Laktamazy nabyte

Od momentu wprowadzenia β -laktamów do terapii zakażeń, obserwuje się gwałtowne przyspieszenie ewolucji oporności na te antybiotyki w populacjach drobnoustrojów chorobotwórczych.

W przypadku bakterii Gram-ujemnych jest to przełom lat 1950 i 1960, kiedy to wprowadzono pierwsze β -laktamy skierowane przeciwko pałeczkom jelitowym (aminopenicyliny i cefalosporyny I generacji). Masowe stosowanie β -laktamów, a także opracowywanie co pewien czas nowych ich rodzajów i generacji (cefamycyny, oksymino-cefalosporyny II, III i IV generacji, monobaktamy, inhibitory β -laktamaz, karbapenemy) były powodami wręcz lawinowego narastania oporności u pałeczek Gram-ujemnych od przełomu lat 1970. i 1980. Kolejne „kamienie milowe” tego procesu odzwierciedlają sekwencję wprowadzania coraz to nowych β -laktamów [39, 51]. Uzyskanie samej oporności na te leki jest głównym kierunkiem tej ewolucji (pojawianie się kolejnych wariantów β -laktamaz), ale ważne są także jej efektywność (podnoszenie ekspresji lub parametrów kinetycznych β -laktamaz, sprzyjające tło genetyczne), ekonomika (poszerzanie spektrów substratowych) oraz rozprzestrzenianie w populacjach bakterii. Istnieje szereg mechanizmów wpływających na ewolucję β -laktamaz, a przez to i wytwarzających je szczepów, z których najważniejszymi są: mobilizacja naturalnych genów β -laktamaz, mutacje strukturalne w genach β -laktamaz, mutacyjne i rekombinacyjne zmiany regulatorowe prowadzące do wzrostu ich ekspresji, koniugacyjny transfer genów β -laktamaz, wreszcie mutacyjne zmiany tła genetycznego podnoszące poziom oporności (defekty poryn, zwiększanie aktywności pomp) [24, 25, 48, 51].

6. Ekspresja β -laktamaz

Zakres i stopień oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe, wywołanej wytwarzaniem β -laktamazy, wynikają z właściwości samego enzymu oraz ze sposobu i poziomu jego ekspresji. Bardzo duże znaczenie ma też tło genetyczne, czyli obecność innych mechanizmów oporności na β -laktamy w danym szczepie. Wytwarzanie β -laktamazy przez komórkę bakteryjną może odbywać się stale na tym samym poziomie (ekspresja konstytutywna) lub w sposób regulowany (ekspresja indukowana), zależny od obecności w środowisku bakterii odpowiednich dla danego gatunku i rodzaju enzymu induktorów β -laktamowych. Poziom ekspresji, zarówno konstytutywnej, jak i w stanie indukcji, może być bardzo różny i wynika on przede wszystkim z wydajności transkrypcji genu kodującego daną β -laktamazę. Transkrypcja genu zależy głównie od siły promotora, a niekiedy też obecności pewnych elementów regulacyjnych, np. attenuatorów transkrypcji. Ponadto, w niektórych szczepach bakterii dochodzi do zwiększenia liczby kopii genu β -laktamazy. Dlatego też ta sama β -laktamaza, nawet w szczepach tego samego gatunku, może być wytwarzana na różnym poziomie [32, 39, 43].

Jak wspomniano wyżej, przykładami enzymów ulegających ekspresji konstytutywnej na bardzo niskim poziomie są naturalne β -laktamazy AmpC *E. coli* i *Acinetobacter* spp. Dzikie szczepy tych drobnoustrojów są wrażliwe na wszystkie β -laktamy aktywne wobec pałeczek Gram-ujemnych. Z kolei *K. pneumoniae* wytwarza gatunkowo-specyficzne β -laktamazy o szerokim spektrum substratowym klasy A (typu SHV-1, LEN lub OKP) na poziomie wystarczającym do nadania szczepom dzikim oporności na amino- i karboksypenicyliny. Charakter indukowany ma natomiast ekspresja cefalosporynaz AmpC charakterystycznych dla *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *P. stuartii* i *P. rettgeri*, a także *P. aeruginosa*. Dzikie szczepy tych gatunków są odporne na te β -laktamy, które są induktorami i jednocześnie substratami AmpC, głównie aminopenicyliny oraz cefalosporyny I i II generacji. Dodatkowo, wskutek mutacji w genach regulatorowych, ww. gatunki mogą wytwarzać β -laktamazy AmpC stale na wysokim poziomie, bez względu na obecność lub brak induktora. Stan trwałego odblokowania produkcji AmpC określa się mianem „derepresji”. Zmutowane szczepy z derepresją AmpC stają się odporne na wszystkie β -laktamy, które są choćby „słabymi” substratami tych cefalosporynaz, czyli wszystkie penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem leków IV generacji) oraz monobaktam i jest to oporność niehamowana lub w niewielkim stopniu hamowana przez inhibitory β -laktamaz – kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam. Częstość derepresji i poziom wytwarzania enzymu w tym stanie zależy od gatunku bakterii. Derepresja β -laktamaz AmpC, związana z bardzo wysokim poziomem produkcji tych enzymów, najczęściej spotykana jest u *Enterobacter cloacae* i *C. freundii* [32, 39, 43].

Zdecydowana większość β -laktamaz nabytych, w tym β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym, ESBL, AmpC i MBL, których geny obecne są na plazmidach, ulega ekspresji konstytutywnej [39, 43]. Jak już wcześniej wspomniano, poziom tej ekspresji zależy głównie od siły promotora genu kodującego β -laktamazę oraz liczby kopii genu w komórce bakteryjnej.

7. Najważniejsze grupy β -laktamaz nabytych

7.1. β -Laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL

ESBL to enzymy zdolne do hydrolizy wszystkich penicylin, cefalosporyn (oprócz cefamycyn) i monobaktamów. Hydrolizują oksymino- β -laktamy z szybkością nie mniejszą niż 10% szybkości hydrolizy benzylopenicyliny. Aktywność większości tych β -laktamaz hamowana jest przez kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam [10, 39]. W systemie funkcjonalnym

β -laktamaz, ESBL zostały zaklasyfikowane do dwóch podgrup grupy 2: podgrupy 2be („ β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym hamowane przez kwas klawulanowy”) oraz podgrupy 2de („ β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym hydrolizujące kloksacylinę”). Według podziału strukturalnego β -laktamaz należą one do klas A (podgrupa 2be) i D (podgrupa 2de). Są to enzymy o masie cząsteczkowej około 30 kDa, w ich miejscu aktywnym znajduje się reszta serynowa [10].

Enzymy ESBL występują głównie jako nabyte, kodowane plazmidowo β -laktamazy. Geny kodujące ESBL zlokalizowane są często na plazmidach koniugacyjnych (np. IncFII, IncI), w tym także o szerokim zakresie gospodarza (np. IncA/C, IncL/M), przez co ulegają szybkiemu rozprzestrzenianiu, również pomiędzy szczepami należącymi do różnych gatunków [15, 29, 47, 59]. Ponadto, występują one w obrębie specyficznych elementów genetycznych (transpozonów, modułów transpozycyjnych, kaset integronowych), co zapewnia im przenoszenie pomiędzy różnymi cząsteczkami DNA, a często też wysoki poziom ekspresji [32, 39, 67]. Jak zaznaczono wyżej, także niektóre gatunkowo-specyficzne β -laktamazy klasy A posiadają cechy ESBL. Wytwarzane są one m.in. przez *K. oxytoca* (β -laktamazy K2 lub K-OXY) [22, 26], *Kluyvera* spp. (KLU) [18, 30, 65, 74], *Serratia fonticola* (SFO) [50], *C. meningosepticum* (CME) [6, 75] lub *Rahnella aquatilis* (RAHN) [5].

Nabyte ESBL, zidentyfikowane po raz pierwszy w 1983 r. [35, 36], są obecnie źródłem poważnych problemów klinicznych i epidemiologicznych na całym świecie. Wytwarzane są przede wszystkim przez szpitalne szczepy pałeczek różnych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*, choć w ostatnim okresie obserwuje się je także coraz częściej w szczepach wywołujących zakażenia pozaszpitalne, głównie u *E. coli*, ale także u *Salmonella* i *Shigella* [12, 61]. Identyfikowane są również u niektórych pałeczek niefermentujących, zwłaszcza *P. aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* [39].

Duża i stale rosnąca częstość występowania ESBL wśród izolatów klinicznych *K. pneumoniae*, która w skali pojedynczego oddziału lub szpitala, a nawet regionu lub kraju może osiągać 40–60% i więcej [21, 61], konsekwentnie zawęża możliwości terapeutyczne antybiotyków β -laktamowych. Ponadto, brak skutecznego leczenia wynika z faktu, że wiele izolatów ESBL+ przejawiało w badaniach *in vitro* wrażliwość na szereg antybiotyków należących do spektrum substratowego ESBL (zwłaszcza oksymino- β -laktamów) ze względu na specyficzne cechy enzymu lub niższy poziom jego ekspresji [39, 77]. Zastosowanie takich leków w terapii kończyło się jednak często niepowodzeniem. Pierwsze takie przypadki odnotowywano już w latach 1980. [7], przeprowadzona zaś pod koniec lat 1990. metaanaliza wykazała, że ryzyko niepowodzenia wynosi ok. 50%

w przypadku zastosowania cefalosporyny III generacji (np. ceftazydymu, cefotaksymu, ceftriaksonu) w leczeniu zakażenia szczepem ESBL+, na którą ten szczep wykazywał wrażliwość *in vitro* [62]. Ryzyko to zależało od wartości MIC (minimalnego stężenia hamującego) danej cefalosporyny i wzrastało jeszcze bardziej w przypadku szczepów, dla których wartość MIC znajdowała się bezpośrednio poniżej wartości granicznej dla szczepów wrażliwych i średniowrażliwych [61, 62]. Zjawisko to związane jest z tzw. efektem inokulum, czyli wzrostu wartości MIC leku wraz ze wzrostem gęstości zawiesiny bakterii (badania lekowrażliwości *in vitro* prowadzi się przy stosunkowo niskiej gęstości zawiesiny bakterii). Ponadto, może dojść do selekcji mutantów o podwyższonej aktywności enzymatycznej ESBL lub zwiększonym poziomie ekspresji β -laktamazy. W związku z tym, potrzeby kliniczne i epidemiologiczne, spowodowały konieczność precyzyjnej identyfikacji fenotypu ESBL+ we wszystkich izolatach *Enterobacteriaceae* w ramach rutynowej diagnostyki laboratoryjnej. Zalecano więc, aby wszystkie izolaty kliniczne, u których stwierdzano obecność ESBL, bez względu na szczegółowy obraz antybiogramu, interpretować jako odporne na wszystkie substraty ESBL (z wyjątkiem izolatów pochodzących z zakażeń dróg moczowych). W ostatnich latach główne ośrodki zajmujące się standaryzacją metod diagnostyki mikrobiologicznej (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, oraz Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) dokonały istotnych zmian w zakresie diagnostyki ESBL. Poprzez zaostrzenie kryteriów oceny wrażliwości pałeczek *Enterobacteriaceae* na oksymino-cefalosporyny, niemal wszystkie szczepy ESBL+ są odporne na tę grupę leków i w związku z tym nie ma już potrzeby ich reklasyfikacji w razie wykrycia tego mechanizmu oporności. Obecnie wykrywanie ESBL prowadzi się wyłącznie do celów epidemiologicznych oraz kontroli zakażeń, i służą temu różne metody (np. test dwóch krążków, DDST – *double-disc synergy test*; E-test), wszystkie jednak sprowadzające się do stwierdzenia znaczącego obniżenia wrażliwości badanego szczepu na przynajmniej jeden z markerowych oksymino- β -laktamów (ceftazydym, cefotaksym, ceftriakson, cefpodoksym, cefepim, aztreonam) i wykazania wpływu inhibitora β -laktamaz (kwasu klawulanowego) na ten efekt [20]. Diagnostykę ESBL utrudnia różnorodność fenotypów oporności szczepów ESBL+ na β -laktamy, której jedynie wycinkiem jest wspomniana wyżej bardzo niska oporność *in vitro* części szczepów na wybrane substraty ESBL. Fenotypy oporności szczepów wytwarzających ESBL zależą od wielu czynników, m.in. szczegółowych preferencji substratowych konkretnych wariantów ESBL, stopnia ich podatności na działanie inhibitorów, poziomu aktywności enzymatycznej i ekspresji oraz obecności innych mechanizmów oporności (inne β -laktamazy, obniżenie

przepuszczalności błony zewnętrznej, wypompowywanie leku). Niektóre z tych mechanizmów, np. wysoka ekspresja cefalosporynazy AmpC, MBL, lub poważne obniżenie przepuszczalności błony zewnętrznej, ze względu na niepodatność na działanie inhibitorów β -laktamaz, mogą maskować obecność ESBL [20]. Innym poważnym problemem w zwalczaniu szczepów o fenotypie ESBL+ jest też fakt, że są one często odporne również na antybiotyki z innych grup terapeutycznych, przez co jeszcze łatwiej mogą ulegać pozytywnej selekcji i utrzymywać się we florze szpitalnej oraz wywoływać epidemie. Geny kodujące ESBL zlokalizowane są na plazmidach, na których z reguły znajdują się też geny warunkujące oporność np. na aminoglikozydy, ko-trimoksazol, tetracykliny lub chloramfenikol [32].

7.2. Cefalosporynazy AmpC

Aktywność cefalosporynaz AmpC, w tym ich bardzo rozległe spektrum substratowe, omówiono w części poświęconej β -laktamazom gatunkowo-specyficznym. Od roku 1988r. obserwuje się również nabyte warianty tych enzymów i są one wytwarzane głównie przez *K. pneumoniae*, *E. coli* i *P. mirabilis* [31, 39, 63]. Za przeniesienie naturalnych genów *ampC* odpowiedzialne są elementy *ISEcp1*, *ISCR1* oraz *IS26*. Ich źródłem były chromosomy *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *M. morgani* i innych bakterii, które dały początek kilku rodzinom nabytych AmpC, takim jak np. MIR, CMY-2, DHA, ACC, MOX, czy FOX [17, 31, 63]. Najbardziej rozpowszechnione są β -laktamazy z rodziny CMY-2, pochodzące od AmpC *C. freundii* [4, 9, 33]. W odróżnieniu od swoich indukowanych prekursorów, większość cefalosporynaz nabytych wytwarzana jest w sposób konstytutywny, ponieważ mobilizacji najczęściej ulegał jedynie gen *ampC*, bez towarzyszącego mu na chromosomie genu regulatorowego *ampR*. Nabyte AmpC nadają szczepom oporność na penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem IV generacji), monobaktamy i połączenia β -laktamów z inhibitorami [31, 63]. Jak w przypadku innych β -laktamaz, poziom oporności szczepów zależy od poziomu ekspresji enzymu [63, 17]. W sensie klinicznym szczepy wytwarzające nabyte AmpC są równie groźne, jak szczepy ESBL+, jednak w sensie epidemiologicznym stanowią one mniejsze zagrożenie ze względu na znacznie mniejszą częstość występowania [31, 63].

7.3. Karbapenemazy

W ciągu ostatnich dziesięciu lat największy niepokój budzą β -laktamazy zdolne do hydrolizy karbapenemów. Karbapenemy to jedna z najnowszych generacji β -laktamów, wprowadzona do leczenia w połowie lat 1980, o najszerszym zakresie działania spośród wszystkich antybiotyków, dobrych parametrach farma-

kologicznych i – co szczególnie ważne – niehydrolizowana przez ESBL i AmpC. Szybkie rozprzestrzenianie się szczepów wytwarzających ESBL spowodowało, że karbapenemy stały się lekami „ostatniej szansy” w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne, zwłaszcza na oddziałach intensywnej terapii [43]. Nieuzasadnione ich stosowanie przyniosło negatywne skutki w postaci selekcji szczepów opornych, najpierw dzięki mechanizmom ograniczającym transport leków, a od 1988 r. także wytwarzaniu β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy. Oba rodzaje oporności początkowo pojawiły się u niefermentujących pałeczek *P. aeruginosa* [39, 51, 41], ale w latach 1990. zaczęto obserwować także szczepy *Enterobacteriaceae* z nabytymi karbapenemazami klasy B, tzw. MBL [44, 58, 42]. W latach 2000. lawinowy wzrost izolacji szczepów wytwarzających karbapenemazy w niektórych regionach świata, coraz częstsze przypadki przenoszenia wraz z pacjentami do innych krajów, wreszcie pojawianie się coraz to nowych typów tych enzymów spowodowało, że jest to obecnie najważniejszy temat w dziedzinie lekooporności drobnoustrojów. Narastanie wielooporności drobnoustrojów wytwarzających karbapenemazy prowokuje do stawiania pytań o przyszłość terapii zakażeń [14, 40]. Karbapenemazy to enzymy o szerokich, a nawet możliwie najszerszych spektrach substratowych, przez co ta często używana nazwa w pewnym sensie jest myląca; oddaje ona jednak to, co w ich aktywności jest najważniejsze [8, 19, 40, 53, 55–57, 68, 72, 80]. Zdumiewająca jest różnorodność strukturalno-ewolucyjna karbapenemaz, obejmująca wszystkie cztery klasy strukturalne β -laktamaz, przede wszystkim jednak klasy A, B i D.

7.3.1. Karbapenemazy klasy A

Najważniejsze karbapenemazy klasy A (podgrupa 2f) to enzymy z rodziny KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), izolowane od 1996 r. w USA. Pochodzenie ewolucyjne tych β -laktamaz nie jest znane, natomiast, zgodnie z nazwą, najczęściej obserwuje się je w szczepach *K. pneumoniae*, choć do chwili obecnej zidentyfikowano je również w wielu innych gatunkach *Enterobacteriaceae*, a nawet *Pseudomonas* spp. i innych pałeczkach niefermentujących. Enzymy z tej rodziny, których dzisiaj znamy już 12, posiadają najszersze spektrum substratowe ze wszystkich β -laktamaz: hydrolizują one wszystkie stosowane klinicznie β -laktamy, choć nie zawsze z taką samą wydajnością (najaktywniejsze są względem penicylin i cefalosporyn I generacji) [11, 55, 57, 72]. Duże znaczenie dla wysokiej oporności szczepów ma obecność dodatkowych mechanizmów (defekty poryn, wytwarzanie dodatkowo ESBL), co jest zjawiskiem równie częstym, jak oporność na inne grupy leków (wielooporność) [16, 34]. Geny *bla*_{KPC} lokują się

w obrębie transpozonu Tn4401 z grupy Tn3 [54], a wraz z nim na plazmidach różnych typów (np. IncFII_K). Wiele z tych plazmidów ma zdolność do koniugacji, jednak jej wydajność jest stosunkowo niewielka [3, 16, 38]. Drobnoustroje KPC⁺ swój „sukces” epidemiologiczny zawdzięczają przede wszystkim rozprzestrzenianiu klonalnemu i związane jest to z tzw. hiperepidemicznym (o wysokim potencjale epidemicznym) klonem *K. pneumoniae* ST258, który najpierw pojawił się w USA, potem został przeniesiony do Izraela, Grecji, a wreszcie dotarł do wielu miejsc na całym niemal świecie [55, 57]. W wymienionych krajach, a także w Polsce, klon ten jest zdecydowanie dominujący [3]. Wszystkie wymienione czynniki powodują, że szczepy KPC⁺ uważa się dziś powszechnie za jedno z największych wyzwań dla zdrowia publicznego w dziedzinie zakażeń bakteryjnych, medycyny (terapia), epidemiologii (zapobieganie, eradykacja) oraz mikrobiologii (wykrywanie, interpretacja wyniku) [8, 40, 55, 57]. Niewątpliwie są one od 2008 r. największym problemem w tym zakresie w Polsce, kiedy to po raz pierwszy zidentyfikowano szczep KPC⁺ [3].

7.3.2. Karbapenemazy klasy B

Wspominane już wcześniej enzymy klasy B (grupy 3), czyli metalo- β -laktamazy (*metallo- β -lactamases*; MBL) są specyficzną grupą β -laktamaz, które nie posiadają reszty serynowej w centrum aktywnym, wymagają natomiast jonów cynku jako kofaktorów reakcji hydrolizy pierścienia β -laktamowego. Z tego powodu są hamowane przez EDTA i inne chelatory jonów dwuwartościowych, pozostają natomiast niewrażliwe na inhibitory β -laktamowe. Są to najbardziej wyspecjalizowane i najaktywniejsze karbapenemazy, ponadto, jest to jedyna klasa β -laktamaz, której wszyscy przedstawiciele wykazują zdolność do hydrolizy karbapenemów. Spektrum substratowe tych enzymów obejmuje również wszystkie penicyliny i cefalosporyny, a MBL nie rozkładają tylko monobaktamów [11, 42, 68, 72, 80]. U bakterii środowiskowych odkryto wiele gatunkowo-specyficznych MBL, jednak żadna z nich nie mogła być prekursorem obserwowanych nabytych enzymów tej grupy. Pierwsze nabyte MBL pojawiły się u Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących *P. aeruginosa* (1988 r. w Japonii) i do dzisiaj są one najczęściej wytwarzane przez ten gatunek bakterii. Od połowy lat 1990. na Dalekim Wschodzie (np. Japonii, Korei, Tajwanie, Chinach), a od 2001 r. w Europie obserwuje się też szczepy *Enterobacteriaceae* MBL⁺. Najważniejszymi rodzinami nabytych MBL są enzymy IMP i VIM, występujące zarówno u pałeczek niefermentujących, jak i jelitowych. Geny *bla*_{IMP} i *bla*_{VIM} istnieją zawsze w postaci kaset włączonych w obręb integronów, głównie klasy 1. Integrony te mogą być z kolei zlokalizowane w transpozonach (np. Tn21) i wraz z nimi przenosić się między cząsteczkami DNA [68, 72, 80].

W Europie problem *Enterobacteriaceae* MBL+ szybko przybrał zatrważające rozmiary w Grecji, gdzie w ciągu pięciu lat szczepy *K. pneumoniae* wytwarzające enzym VIM-1 stanowiły ok. 50% populacji tego gatunku w środowiskach oddziałów intensywnej terapii [79]. U podłoża tego procesu było rozprzestrzenianie się kilku klonów *K. pneumoniae*, ale też intensywny transfer plazmidów (typu IncN) [23, 52]. Sytuacja ta uwidoczniła, jak wielkie zagrożenie niesie narastanie lekooporności bakterii chorobotwórczych, w przypadku gdy nie zostaną podjęte energiczne działania zapobiegawcze na poziomach lokalnym i państwowym. Drobnoustroje wytwarzające MBL z rodziny VIM pojawiły się później w Hiszpanii i innych krajach Europy, niekiedy w wyniku przeniesienia pacjenta ze szpitala w Grecji [27].

W 2010 r. wielki rozgłos zyskała sprawa identyfikacji nowego rodzaju MBL – enzymu NDM-1, wykrytego w wieloopornym szczepie *K. pneumoniae* w Szwecji u pacjenta, który wcześniej hospitalizowany był w Indiach. W ślad za pierwszym doniesieniem pojawiły się kolejne prace ukazujące niezwykle rozprzestrzenienie szczepów NDM-1+ różnych gatunków *Enterobacteriaceae* w Indiach, Pakistanie i Bangladeszu (także w środowisku pozaszpitalnym) oraz wskazujących wymienione kraje jako źródło tych szczepów przeniesionych do Wielkiej Brytanii i szeregu różnych państw europejskich, USA, Australii, krajów Zatoki Perskiej i Afryki [37, 56, 82]. Szczepy NDM+ są z reguły wysoce odporne i – tak jak KPC+ – wielooporne [56]. Geny bla_{NDM} tworzące operon wraz z genem oporności na bleomycynę (ble_{MBL}), położone są obok elementu IS*Aba125*, który prawdopodobnie odpowiedzialny był za ich mobilizację z chromosomu nieznanego gatunku. Charakter sekwencji IS*Aba1* oraz kilka innych przesłanek sugerują, że niefermentująca pałeczka *A. baumannii* mogła być pierwszym gatunkiem, który nabył geny bla_{NDM} i stąd dopiero nastąpiło przeniesienie do rodziny *Enterobacteriaceae* (szczepy *A. baumannii* NDM+ są stosunkowo często izolowane w niektórych krajach). Obecność bla_{NDM} w plazmidach o wysokim potencjale koniugacyjnym (IncN, IncL/M, IncA/C, IncFII) sprawia, że transfer horyzontalny jest głównym sposobem rozprzestrzeniania się karbapenemaz NDM wśród bakterii, przy czym wielkie znaczenie ma tu również wysoka aktywność transpozycyjna elementów zawierających bla_{NDM} („epidemia transpozonu”) [64]. W ramach wspomnianego wcześniej rozgłosu medialnego, w którym *K. pneumoniae* NDM-1+ nazwano „superbakterią”, po raz pierwszy powszechniej uświadomiono sobie wymiar ekonomiczny i nawet społeczno-polityczny narastania oporności bakterii na antybiotyki w dzisiejszym świecie. Wspomniane doniesienia uderzyły bowiem w intensywnie rozwijającą się, nową gałąź gospodarki niektórych krajów, czyli rynek tanich usług medycznych [60, 81] [R o b e r t s M.: New ‘superbug’ found in UK hospitals. BBC News Health, 11 sierpnia 2010].

Warto nadmienić, że w 2011 r. pierwszy szczep *E. coli* NDM+ wyizolowano w Polsce u pacjenta przeniesionego ze szpitala w jednym z krajów środkowo-afrykańskich [M. G n i a d k o w s k i, J. F i e t t, A. B a r a n i a k, R. I z d e b s k i, D. Ż a b i c k a, K. F i l c z a k, W. H r y n i e w i c z; dane niepublikowane].

7.3.3. Karbapenemazy klasy D

β -Laktamazy hydrolizujące karbapenemy klasy D (podgrupa 2df), czyli tzw. enzymy CHDL (*carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*) spotykane są od początku lat 1980. u przedstawicieli rodzaju niefermentujących pałeczek *Acinetobacter* i u tych drobnoustrojów stanowią główne źródło oporności na karbapenemy [66]. W 2001 r. pojawił się w Turcji ich nowy rodzaj, OXA-48, związany wyłącznie z *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza *K. pneumoniae*, ale też *E. coli*, *E. cloacae* i innymi gatunkami [57]. CHDL mają stosunkowo słabą aktywność wobec karbapenemów, a poza nimi hydrolizują jeszcze tylko penicyliny i cefalosporyny I generacji [11, 66]. Niemniej, wysoka ekspresja i częsta obecność licznych innych mechanizmów oporności (w tym wytwarzanie ESBL) powoduje, że szczepy OXA-48+ są, podobnie do KPC+ i MBL+, wysoce odporne na wszystkie β -laktamy i wiele innych grup leków [13]. Gen bla_{OXA-48} leży w transpozonie Tn1999, utworzonym przez dwie sekwencje IS1999, ale blisko z nim spokrewniony gen $bla_{OXA-181}$ jest położony w bezpośrednim pobliżu IS*Ecp1* [13, 70]. Koniugacyjny transfer specyficznej grupy plazmidów uważany jest za główny mechanizm rozprzestrzeniania się OXA-48 w populacjach *Enterobacteriaceae* [13]. Szczepy z β -laktamazami typu OXA-48 są kolejnym przykładem szybkiego przenikania do Europy niebezpiecznych drobnoustrojów z regionów endemicznych, którymi są w tym przypadku głównie kraje wschodniej i południowej części basenu Morza Śródziemnego. Szczepy OXA-48+ z Turcji i północnej Afryki (Egipt, Maroko) napływają do Europy i wywołują epidemie szpitalne we Francji, Holandii, Niemczech, Hiszpanii i innych krajach. Ostatnio również stwierdzono pojawienie się szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających bardzo podobne enzymy: OXA-181 w Indiach i OXA-204 w Tunezji [27, 56, 69].

8. Podsumowanie

Problematyka oporności bakterii chorobotwórczych na antybiotyki stała się jednym z najbardziej palących wyzwań dla medycyny zakażeń i zdrowia publicznego w ostatnich dekadach. Szacuje się, że krajach Unii Europejskiej lekooporność drobnoustrojów jest przyczyną śmierci ok. 25 000 osób rocznie, ponadto, zwiększa ona też znacznie koszty opieki zdrowotnej i koszty społeczne

[73]. Wytwarzanie β -laktamaz hydrolizujących antybiotyki β -laktamowe nowych generacji niewątpliwie należy obecnie do najgroźniejszych mechanizmów oporności bakterii na leki. Głównym problemem jest pojawianie się i rozprzestrzenianie szczepów pałeczek Gram-ujemnych, zarówno jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* jak i niefermentujących, wytwarzających enzymy nabyte, takie jak ESBL, AmpC i karbapenemazy. Szczepy te wykazują oporność także na leki nie β -laktamowe. Europejskie Centrum Kontroli Chorób, ECDC (*European Centre for Disease Control*), wyróżnia wśród nich szczepy wielooporne, czyli niewrażliwe na co najmniej trzy grupy leków (*multi-drug resistant*, MDR), szczepy o rozszerzonej wielooporności (*extensively drug-resistant*, XDR) oraz szczepy całkowicie odporne (*pandrug-resistant*, PDR) [46]. Zaliczane one są do tzw. „patogenów alarmowych”, których pojawienie się powinno prowadzić do wdrażania zaostrzonych procedur kontroli zakażeń. Niezwykle ważna jest ich niezwłoczna i wiarygodna identyfikacja w laboratoriach mikrobiologicznych. Znaczące ograniczenie lub – niekiedy – całkowity brak opcji terapeutycznych wobec tak istotnych czynników zakażeń stanowi z oczywistych względów wielkie zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Podziękowania

Powstanie tej publikacji było możliwe dzięki częściowemu wsparciu z funduszu programu zdrowotnego Ministerstwa Zdrowia „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków” (NPOA).

Piśmiennictwo

- Ambler R. P., Coulson A. F., Frere J. M., Ghuysen J. M., Joris B., Forsman M., Levesque R. C., Tiraby G., Waley S. G.: A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* **276**, 269–270 (1991)
- Ambler R. P.: The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **289**, 321–331 (1980)
- Baraniak A., Grabowska A., Izdebski R., Fiett J., Herda M., Bojarska K., Zabicka D., Kania-Pudlo M., Młynarczyk G., Zak-Pulawska Z., Hryniewicz W., Gniadkowski M., the KPC-PL Study Group: Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5493–5499 (2011)
- Barlow M., Hall B.G.: Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1190–1198 (2002)
- Bellais S., Poirel L., Fortineau N., Decousser, J.W., Nordmann P.: Biochemical-genetic characterization of the chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Rahnella aquatilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2965–2968 (2001)
- Bellais S., Poirel L., Naas T., Girlich D., Nordmann P.: Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A β -lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1–9 (2000)
- Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., Duval J.: Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*, **2**, 302–306 (1987)
- Bush K.: Alarming β -lactamase-mediated resistance in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 558–564 (2010)
- Bush K., Fisher J.F.: Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 455–478 (2011)
- Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233 (1995)
- Bush K., Jacoby G.A.: Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010)
- Canton R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T.M.: Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 144–153 (2008)
- Carrèr A., Poirel L., Yilmaz M., Akan O.A., Feriha C., Cuzon G., Matar G., Honderlick P., Nordmann P.: Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1369–1373 (2010)
- Cohen M. L.: Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, **257**, 1050–1055 (1992)
- Coque T. M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Canton R., Nordmann P.: Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 195–200 (2008)
- Cuzon G., Naas T., Truong H., Villegas M.V., Wisell K., Carmeli Y., Gales A.C., Navon-Venezia S., Quinn J.P., Nordmann P.: Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1349–1356 (2010)
- D'Andrea M. M., Literacka E., Zioga A., Giani T., Baraniak A., Fiett J., Sadowy E., Tassios P. T., Rossolini G. M., Gniadkowski M., Miriagou V.: Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2735–2742 (2011)
- Decousser J.W., Poirel L., Nordmann P.: Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3595–3598 (2001)
- Deshpande P., Shetty A., Kapadia F., Hedge A., Soman R., Rodrigues C.: New Delhi metallo 1: have carbapenems met their doom? *Clin. Infect. Dis.* **51**, 1222 (2010)
- Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V.: Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 90–103 (2008)
- Empel, J., Baraniak A., Literacka E., Mrówka A., Fiett J., Sadowy E., Hryniewicz W., Gniadkowski M.: Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2449–2454 (2008)
- Fournier B., Roy P.H.: Variability of chromosomally encoded β -lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1641–1648 (1997)
- Giakkoupi P., Xanthaki A., Kanelopoulou M., Vlahaki A., Miriagou V., Kontou S., Papafraggas E., Malamou-Lada H., Tzouveleki L.S., Legakis N.J., Vatopoulos A.C.: VIM-1 Metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3893–3896 (2003)
- Gniadkowski M.: Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 597–608 (2001)

25. Gniadkowski M.: Evolution of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 11–32 (2008)
26. Granier S.A., Leflon-Guibout V., Goldstein F.W., Nicolas-Chanoine M.H.: New *Klebsiella oxytoca* β -lactamase genes bla(OXY-3) and bla(OXY-4) and a third genetic group of *K. oxytoca* based on bla(OXY-3). *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2922–2928 (2003)
27. Grundmann H., Carmeli Y. i wsp.: Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro. Surveill.* **15**, 19711 (2010)
28. Hernández J.R., Martínez-Martínez L., Cantón R., Coque T.M., Pascual A., the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH): Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2122–2125 (2005)
29. Hopkins K.L., Liebana E., Villa L., Batchelor M., Threlfall E.J., Carattoli A.: Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3203–3206 (2006)
30. Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R., Philippon A.: β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3045–3049 (2002)
31. Jacoby G.A.: AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 161–182 (2009)
32. Jacoby G.A., Bush K.: β -Lactam Resistance in the 21st Century (w) Frontiers in Antimicrobials Resistance. red. D.G White, M.N. Alekshun, P.F. McDermott, S.B. Levy, ASM Press, USA, 2005, 53–65
33. Jacoby G.A., Griffin C.M., Hooper D.C.: *Citrobacter* spp. as a source of qnrB alleles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4979–4984 (2011)
34. Kitchel B., Rasheed J.K., Endimiani A., Hujer A.M., Anderson K.F., Bonomo R.A., Patel J.B.: Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4201–4207 (2010)
35. Kliebe C., Nies B.A., Meyer J.F., Tolxdorff-Neutzling R.M., Wiedemann B.: Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 302–307 (1985)
36. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **11**, 315–317 (1983)
37. Kumarasamy K.K., Woodford N.I. i wsp.: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infect. Dis.* **10**, 597–602 (2010)
38. Leavitt A., Chmelnitsky I., Carmeli Y., Navon-Venezia S.: Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4493–4496 (2010)
39. Livermore D.M.: Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 557–584 (1995)
40. Livermore D.M.: Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.* **64** (Suppl. 1), 29–36 (2009)
41. Livermore D.M.: Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 247–250 (2001)
42. Livermore D.M.: The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **3**, 218–224 (2002)
43. Livermore D.M., Williams J.D.: β -Lactams: Mode of Action and Mechanism of Bacterial Resistance (w) Antibiotics in Laboratory Medicine, wyd. 4, red. V. Lorian, Williams & Wilkins, USA, 2000, s. 502
44. Livermore D.M., Woodford N.: The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* **14**, 413–420 (2006)
45. Luzzaro F., Mezzatesta M., Mugnaioli C., Perilli M., Stefani S., Amicosante G., Rossolini G.M., Toniolo A.: Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1659–1664 (2006)
46. Magiorakos A.P., Monnet D.L. i wsp.: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international export proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268–281 (2012)
47. Marcade G., Deschamps C., Boyd A., Gautier V., Picard B., Branger C., Denamur E., Arlet G.: Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 67–71 (2009)
48. Martínez-Martínez L.: Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 82–89 (2008)
49. Massova I., Mobashery S.: Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1–17 (1998)
50. Matsumoto Y., Inoue M.: Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 307–313 (1999)
51. Medeiros A.A.: Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24** (Suppl. 1), 19–45 (1997)
52. Miriagou V., Papagiannitsis C.C., Kotsakis S.D., Loli A., Tzelepi E., Legakis N.J., Tzouvelelis L.S.: Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the bla_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4497–4500 (2010)
53. Moellering R.C. Jr.: NDM-1 – a cause for worldwide concern. *N. Engl. J. Med.* **363**, 25 (2010)
54. Naas T., Cuzon G., Villegas M.V., Lartigue M.F., Quinn J.P., Nordmann P.: Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla_{KPC} gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1257–1263 (2008)
55. Nordmann P., Cuzon G., Naas T.: The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 228–236 (2009)
56. Nordmann P., Poirel L., Toleman M.A., Walsh T.R.: Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 689–692 (2011)
57. Nordmann P., Naas T., Poirel L.: Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1791–1798 (2011)
58. Nordmann P.: Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin. Infect. Dis.* **27** (Suppl. 1), 100–106 (1998)
59. Novais A., Canton R., Moreira R., Peixe L., Baquero F., Coque T.M.: Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 796–799 (2007)
60. Palmer R.: A disease – or gene – by any other name would cause a stink. *Nature Medicine*, **16**, 1059 (2010)
61. Paterson D.L., Bonomo R.A.: Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657–686 (2005)
62. Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Casellas J.M., Mulazimoglu L., Klugman K.P., Bonomo R.A., Rice L.B.,

- McCormack J.G., Yu V.L.: Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2206–2212 (2001)
63. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A.: Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1–11 (2002)
64. Poirel L., Dortet L., Bernabeu S., Nordmann P.: Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5403–5407 (2011)
65. Poirel L., Kampf P., Nordmann P.: Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 4038–4040 (2002)
66. Poirel L., Naas T., Nordmann P.: Diversity, epidemiology and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 24–38. (2010)
67. Poirel L., Naas T., Nordmann P.: Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 75–81 (2008)
68. Poirel L., Pitout J.D., Nordmann P.: Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* **2**, 501–512 (2007)
69. Poirel L., Potron A., Nordmann P.: OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1597–1606 (2012)
70. Potron A., Nordmann P., Lafeuille E., Al Maskari Z., Al Rashdi F., Poirel L.: Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4896–4899 (2011)
71. Pulcini C., Bush K., Craig W.A., Fridmodt-Møller N., Grayson M.L., Mouton J.W., Turnidge J., Harbarth S., Gyssens I.C., ESCMID Study Group for Antibiotic Policies: Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 268–274 (2012)
72. Qenan A.M., Bush K.: Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007)
73. Rezolucja Parlamentu Europejskiego z dn. 27 października 2011 r. w sprawie zagrożenia zdrowia publicznego w wyniku oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (nr B7 0538/2011)
74. Rodriguez M.M., Power P., Radice M., Vay C., Famiglietti A., Galleni M., Ayala J.A., Gutkind G.: Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4895–4897 (2004)
75. Rossolini G.M., Franceschini N., Lauretti L., Caravelli B., Riccio M.L., Galleni M., Frere J.M., Amicosante G.: Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*blaA(CME)*) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2193–2199 (1999)
76. Rozenberg-Arska M., Visser M.R.: *Enterobacteriaceae* (w) Infectious diseases, Wyd. 2, red. J. Cohen, W.G. Powderly i wsp., Mosby, USA, 2004, s. 2189
77. Sanders C.C., Thomson K.S., Bradford P.A.: Problems with detection of β -lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**, 411–424 (1993)
78. Schmitz F.J., Fluit A.C.: Mechanisms of antibacterial resistance (w) Infectious diseases, Wyd. 2, red. J. Cohen, W.G. Powderly i wsp., Mosby, USA, 2004, s. 1733
79. Vatopoulos A.: High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro. Surveill.* **13**, 8023 (2008)
80. Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P.: Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 306–325 (2005)
81. Walsh T.R., Toleman M.A.: The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1–3 (2012)
82. Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., Toleman M.A.: Dissemination of NDM-1-positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 355–362 (2011)

Paweł Łaniewski¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka*¹

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. Charakterystyka patogenu i epidemiologia zakażeń. 2. Objawy chorobowe i źródła zakażeń. 3. Szczepionki anty-*Campylobacter*. 4. Podjednostkowe szczepionki anty-*Campylobacter* skonstruowane z użyciem atenuowanych szczepów *S. enterica*. 5. Podsumowanie

Anti-*Campylobacter* immunoprophylaxis

Abstract: *Campylobacter jejuni* is currently recognized as a major cause of food-borne human gastroenteritis worldwide. In developed countries the majority of *Campylobacter* infections are associated with the consumption of undercooked poultry meat. Although a disease lasts only several days and is very often self-limiting, campylobacteriosis constitutes a serious medical and socioeconomic problem. In patients, especially from developed countries, who have not encountered the pathogen before the infection can result in severe gastroenteritis accompanied with long-lasting bloody or mucus diarrhea. Moreover, *C. jejuni* can cause septicemia in immunocompromised individuals or induce autoimmune neurological disorders. Rapidly increasing antibiotic resistance of *Campylobacter* strains compels us to develop alternative therapeutic strategies. Implementation of immunoprophylaxis for humans or chickens seems to be the most effective strategy to decrease the number of human infections. Subunit vaccines are the safest, but mildly immunogenic, prophylactic method therefore, heterologous antigens are frequently delivered to a host by special delivery vectors i.e. attenuated *Salmonella* strains, to induce protective immune response. Avirulent *Salmonella* strains were also successfully used as a carrier to construct anti-*Campylobacter* subunit vaccines. Up till now, only several *Campylobacter* genes encoding immunogenic proteins: Peb1A, CjaA, Pal, Cj0420 and bacterioferritin, were cloned in *Salmonella* cells and the immune response and protection efficiency of constructed vaccine were determined on animal models. Here, we discuss the recent developments in the field of *Salmonella*-based anti-*Campylobacter* vaccines.

Contents: 1. Pathogen characteristics and infection epidemiology. 2. The symptoms and source of infections. 3. Anti-*Campylobacter* vaccines. 4. Anti-*Campylobacter* subunit vaccines constructed with attenuated *S. enterica* cells. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: antygen, *Campylobacter*, *Salmonella*, szczepionka podjednostkowa

Key words: antigen, *Campylobacter*, *Salmonella*, subunit vaccine

1. Charakterystyka patogenu i epidemiologia zakażeń

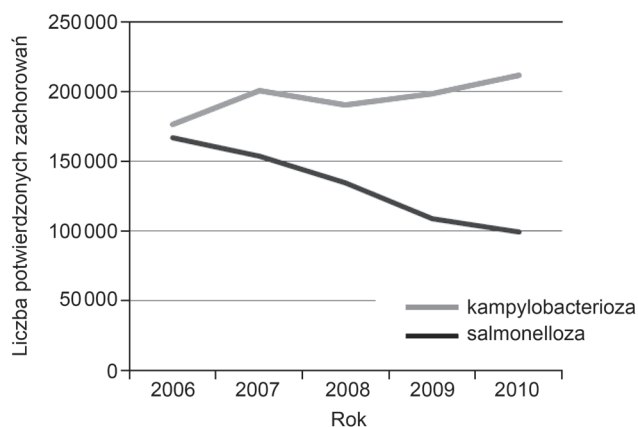
Bakterie z rodzaju *Campylobacter* to Gram-ujemne, mikroaerofilne, spiralne, ruchliwe pałeczki należące do klasy ϵ -*Proteobacteria*. Aktualnie mikroorganizmy te są najczęściej izolowanym czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych przewodu pokarmowego u ludzi zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się [3,33]. Infekcje wywoływane są głównie przez dwa nierozróżnialne pod względem klinicznym gatunki: *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Wg raportu EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, *European Food Safety Agency*) i ECDC (Europejskie Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób, *European Center for Disease Control and Prevention*) odpowiadają one za 35,7% i 2,3% odnotowanych przypadków kampylobakteriozy w Unii Europejskiej (UE) w 2010 r. [6].

Dane epidemiologiczne wskazują, iż liczba przypadków kampylobakteriozy w skali światowej sięga aż 400 milionów rocznie (48). Wg danych CDC (Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorób, *Center for Disease Control and Prevention*) każdego roku infekcje *Campylobacter* powodują ok. 2–3 miliona przypadków zachorowań w USA

(<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/technical.html#incidence>). W UE liczba przypadków kampylobakteriozy szacowana jest na przynajmniej 2 miliony, a może sięgać nawet 20 milionów rocznie [7]. Wg raportów EFSA w UE od 2005 do 2010 r. kampylobakterioza była nieprzerwanie najczęściej występującą chorobą odzwierzęcą. We wszystkich krajach członkowskich w 2010 r. odnotowano 212 064 przypadków zakażeń *Campylobacter* sp. [6]. W porównaniu do roku poprzedniego był to wzrost o 6,7%. W tym samym czasie odnotowano 99 020 przypadków salmonellozy, drugiej najczęściej występującej zoonozy. Jednakże w przypadku zakażeń pałeczkami *Salmonella* ich liczba od 5 lat systematycznie się obniża (w 2010 r. spadek o 8,8% w porównaniu do roku poprzedniego) (Rys. 1).

Liczba zdiagnozowanych przypadków kampylobakteriozy w poszczególnych krajach UE ze względu na odmienne systemy monitorowania zakażeń bakteryjnych znacznie się różniła i wynosiła od 0,04 do 200,58 przypadków zachorowań na 100 000 mieszkańców. W Polsce w 2010 r. potwierdzono jedynie 367 przypadków kampylobakteriozy (0,96 zachorowań na 100 000 osób). Tak niski poziom wynika prawdopodobnie z faktu, iż

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Kinetyka zachorowań na kampylobakteriozę i salmonellozę w Unii Europejskiej w latach 2006–2010 wg [6]

w Polsce dopiero od niedawna rejestruje się przypadki kampylobakteriozy jako wyodrębnionej jednostki chorobowej. Co więcej szacuje się, że tylko co dziesiąty przypadek kampylobakteriozy jest odnotowywany, reszta zakażonych osób ze względu na łagodny przebieg infekcji prawdopodobnie nie zgłasza się do lekarza.

2. Objawy chorobowe i źródła zakażeń

Kliniczna manifestacja zakażeń *Campylobacter* spp. bywa bardzo różnorodna i waha się od przypadków asymptomatycznych do ostrych stanów zapalnych jelit, którym towarzyszy długotrwała, krwawa lub śluzowata biegunka [1]. Te ostatnie symptomy chorobowe charakterystyczne są dla osób zakażonych z krajów rozwiniętych, które w przeszłości nie zetknęły się z patogenem. W większości przypadków stan chorobowy trwa kilka dni, a infekcje mają tendencję do samowyleczenia. Jednakże u ludzi z obniżoną odpornością (dzieci w wieku poniżej 2 lat, osoby starsze, osoby po przebytych chorobach nowotworowych czy zakażeni wirusem HIV) infekcje *Campylobacter* są często przyczyną zakażeń ogólnoustrojowych oraz posocznicy [20]. Dodatkowo udokumentowano, że infekcje *Campylobacter* mogą prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych i neurologicznych: reaktywnego artretyzmu i neuropatii obwodowego układu nerwowego tj. zespół Guillaína-Barrégo (GBS) czy chorób zapalnych jelit (IBD, *inflammatory bowel diseases*, tj. choroba Leśniowskiego-Crohna [18, 22, 29]. *Campylobacter* jest także drugą po zakażeniach enterotoksycznymi szczepami *E. coli* (ETEC) przyczyną biegunek podróżnych [8].

W krajach rozwiniętych do zakażeń pałeczkami *Campylobacter* u ludzi dochodzi najczęściej przez spożycie zanieczyszczonego pałeczkami patogenu mleka, wody lub mięsa, zwłaszcza nieodpowiednio przygotowanego drobiu [17]. Niewątpliwie głównym źródłem patogenu są kurczęta ulegające kolonizacji we

wczesnym okresie życia. Potwierdza to ostatni raport EFSA i ECDC, który wskazuje, że w 2010 r. w UE aż 2/3 (17 z 27) ognisk epidemiologicznych (*outbreak*) kampylobakteriozy o udokumentowanym źródle powiązanych było z zanieczyszczonym *Campylobacter* mięsem drobiowym [6]. Mechanizm zapoczątkowania infekcji kurcząt na fermach pozostaje niewyjaśniony, lecz niezależnie od źródła zakażenia *Campylobacter* rozprzestrzenia się w stadach kurcząt bardzo szybko doprowadzając do zakażenia nawet 100% ptaków [30]. Chociaż poziom kolonizacji jelit kurcząt jest bardzo wysoki (nawet 10^{10} CFU na gram zawartości jelit), nie wywołuje to u ptaków objawów chorobowych. Fakt ten uniemożliwia eliminację ze stad osobników zainfekowanych [17]. Do dalszego zanieczyszczenia mięsa drobiowego dochodzi w rzeźniach, stąd wysoki procent tusz kurcząt znajdujących się na rynku zawiera duże liczby komórek tego drobnoustroju. Podczas przetwarzania mięsa komórki patogenu przedostają na skórę tusz drobiowych poprzez zanieczyszczenie zawartością przewodu pokarmowego. Specyficzne mikrośrodowisko na powierzchni tusz sprzyja przetrwaniu pałeczek w temperaturze 4°C, a nawet po zamrożeniu. Dodatkowo wykazano, iż patogen w przypadku nieodpowiedniego przechowywania mięsa może ulec w tymże środowisku namnożeniu [41]. Wg danych EFSA i ECDC w 2010 r. 29,6% tusz drobiowych w UE było zanieczyszczonych pałeczkami *Campylobacter* [6]. W poszczególnych krajach członkowskich udział zakażonego świeżego mięsa wynosił od 3,1% aż do 90,0%. Ponieważ dawka infekcyjna dla człowieka jest względnie niska (10^2 CFU), do zakażeń człowieka może dochodzić stosunkowo łatwo i często [20].

Dodatkowym problemem z medycznego punktu widzenia jest zjawisko nasilającej się antybiotykooporności bakterii z rodzaju *Campylobacter* wynikające z nadmiernego i często nieuzasadnionego stosowania antybiotyków w praktyce weterynaryjnej jak i terapii ludzi. Jak wcześniej wspomniano w większości przypadków zakażenia *Campylobacter* przebiegają w łagodny sposób i wymagają jedynie leczenia objawowego (obserwacja, uzupełnienie płynów i elektrolitów). Antybiotykoterapię stosuje się jedynie w przypadku ciężkiego przebiegu choroby. Badania epidemiologiczne pokazują jednak gwałtowny wzrost oporności na powszechnie stosowane terapeutyki (tj. makrolidy, fluorochinolony i tetracyklinę) zarówno wśród klinicznych szczepów *C. jejuni/coli* jak i szczepów izolowanych z pożywienia [10, 26, 27]. Wykazano także rosnącą liczbę szczepów wieloopornych, co niewątpliwie utrudnia zwalczanie przypadków kampylobakteriozy, wydłużając okres leczenia lub powodując całkowitą nieskuteczność stosowanej terapii. W przypadku ogólnoustrojowych infekcji spowodowanej przez szczepy *Campylobacter* odporne na makrolidy i fluorochinolony jedyną alternatywą wydaje się zastosowanie gentamycyny [31, 41].

3. Szczepionki anty-*Campylobacter*

Ograniczenie liczby przypadków kampanylobakteriozy u ludzi można osiągnąć na drodze obniżenia poziomu zakażeń stad drobiu. W ramach multidyscyplinarnego programu CARMA (*Campylobacter Risk Management and Assessment*) badano wprowadzanie różnego rodzaju interwencji w procesie produkcji, przetwarzania i spożycia mięsa drobiowego (*from farm to fork*) tj. podniesienie poziomu higieny na fermach, rzeźniach i przedsiębiorstwach procesujących żywność czy edukacja społeczeństwa [14]. Metody te okazały się jednak nieskuteczne, stąd wprowadzenie do powszechnego stosowania szczepień ochronnych ludzi lub kurcząt wydaje się najwłaściwszą strategią zapobiegania ludzkim przypadkom kampanylobakteriozy.

Jak dotąd na świecie nie ma dostępnej na rynku skutecznej szczepionki anty-*Campylobacter*, pomimo iż od kilkunastu lat europejskie i amerykańskie ośrodki naukowe wraz z firmami biotechnologicznymi prowadzą intensywne badania w tym kierunku. Szczepionka anty-*Campylobacter* dla ludzi przeznaczona będzie prawdopodobnie tylko dla osób z grupy podwyższonego ryzyka tj. personelu medycznego, osób podróżujących do regionów świata, gdzie kampanylobakterioza jest chorobą endemiczną lub osób zagrożonych rozwojem chorób autoimmunizacyjnych [46]. Ze względu na występujące zjawisko mimikry molekularnej pomiędzy lipooligosacharydem (LOS) *C. jejuni* a ludzkimi gangliozydami badania kliniczne prototypów szczepionek na ludzkich ochotnikach wiązały się z ryzykiem wystąpienia u pacjentów chorób autoimmunizacyjnych. Identyfikacja szczepu *C. jejuni* CG8421, niewywołującego u ludzi GBS, niewątpliwie ułatwi testowanie tego rodzaju szczepionek [45].

Badane prototypy szczepionek anty-*Campylobacter* przeznaczone zarówno dla ludzi jak i kurcząt ogólnie można podzielić na szczepionki skonstruowane w oparciu o zabite komórki drobnoustroju tzw. CWC (*Campylobacter whole-cell vaccines*) oraz szczepionki podjednostkowe zawierające jedynie wybrane antygeny *Campylobacter* [5, 19]. Charakterystykę ostatnio badanych szczepionek anty-*Campylobacter* przedstawiono w Tab. I.

Szczepionki anty-*Campylobacter* zawierające całe komórki patogenu mają kilka ograniczeń. Najważniejszym z nich jest wysoki poziom zmienności genetycznej *C. jejuni* [11, 34]. Mikroorganizmy te posiadają się tzw. „otwarty” pangenom (pula wszystkich genów obecna w genomach przedstawicieli danego gatunku lub rodzaju). Oznacza to, że poznanie materiału genetycznego kolejnych szczepów *C. jejuni* wzbogaca pangenom gatunku o kolejne unikatowe geny. Porównanie materiału genetycznego 13 szczepów *C. jejuni* wykazało, że jedynie 2/3 genów stanowią tzw. geny podstawowe (*core genes*), występujące w genomach wszystkich przedstawicieli gatunku. Reszta genów była specyficzna dla poszczególnych szczepów lub kilku przedstawicieli gatunku (*dispensable/auxillary genes*). Przykładowo genom *C. jejuni* M1 składa się z 1080 genów podstawowych i aż 547 genów dodatkowych [9]. Analiza materiału genetycznego 5 blisko spokrewnionych szczepów ST-21 wyizolowanych z różnych źródeł (tj. klinicznych i środowiskowych) i scharakteryzowanych za pomocą techniki MLST (*multi locus sequence typing*) wykazała ich wysoką zmienność fenotypową i genetyczną, co niewątpliwie warunkuje ich zdolność przystosowawczą do różnych środowisk [13]. Ostatnio przeprowadzone analizy transkryptomów oraz proteomów *C. jejuni* wykazały także olbrzymią zmienność profilu

Tabela I

Prototypy podjednostkowych szczepionek anty-*Campylobacter* skonstruowanych z wykorzystaniem atenuowanych szczepów *S. enterica*

Badany antygen	Rodzaj atenuacji	Lokalizacja transgenu	Model zwierzęcy	Efekt szczepienia	Piśmiennictwo
Peb1A	$\Delta phoPQ$	plazmid	myszy	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgG; brak protekcji	[42]
CjaA	$\Delta crp \Delta cya$	plazmid	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie kolonizacji o 6 log	[50]
	$\Delta aroA$	plazmid	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał; obniżenie poziomu kolonizacji o 1,4 log	[2]
	$\Delta aroA \Delta htr$	chromosom	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie poziomu kolonizacji o 2 log	[23]
Pal	$\Delta aroA \Delta htr$	chromosom	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie poziomu kolonizacji o 4 log	[23]
	$\Delta crp \Delta cya$	plazmid	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; brak protekcji	(Łaniewski i wsp. dane niepublikowane)
Cj0420	$\Delta aroA \Delta htr$	chromosom	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie poziomu kolonizacji o 1 log	[23]
Cj1534c	$\Delta P_{fur33}::TT \text{ araC } P_{BAD} \text{ fur } \Delta pmi \Delta (gmd-fcl) \Delta asdA$	plazmid	kurczęta	obniżenie poziomu kolonizacji o 3,6 log	[21]

białkowego mikroorganizmu w zależności od warunków i fazy wzrostu [25, 49]. Dodatkowo badania wykazały, iż kurczęta w trakcie swojego życia wielokrotnie ulegają kolonizacji przez różne szczepy *Campylobacter* spp. [43], stąd skonstruowanie skutecznej szczepionki CWC dla kurcząt wydaje się bardzo trudne. W przypadku ludzi użycie takiej szczepionki, bez dokładnego poznania mechanizmów patogenezы pałeczek *C. jejuni* jest dość ryzykowne, gdyż może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych.

Szczepionki podjednostkowe uważane są za najbardziej bezpieczne, lecz ich immunogenność w porównaniu do szczepionek zawierających żywe atenuowane komórki jest dużo niższa. W procesie konstrukcji tego typu szczepionek krytyczny jest wybór antygenów. Pałeczki *C. jejuni* posiadają wiele białek o właściwościach immunogennych, jednakże niewiele z nich posiada odpowiedni potencjał ochronny. Rozwój badań z dziedziny genomiki, transkryptomiki i proteomiki w ostatnich latach niewątpliwie przyczynił się do dużego postępu w identyfikacji nowych antygenów. Jednakże do tej pory na zwierzętach laboratoryjnych testowano tylko kilka potencjalnych kandydatów do konstrukcji szczepionki – głównie w postaci oczyszczonych rekombinowanych białek lub produkowanych w żywych atenuowanych szczepach bakteryjnych [19].

4. Podjednostkowe szczepionki anty-*Campylobacter* skonstruowane z użyciem atenuowanych szczepów *S. enterica*

Jako nośnik genów *C. jejuni* z powodzeniem wykorzystano m.in. atenuowane szczepy *S. enterica*. Zastosowana strategia powinna podwyższyć lub/i ukierunkować

odpowieź immunologiczną szczepionego gospodarza i zapewnić efekt ochronny. W celu dostarczenia antygenów *C. jejuni* do komórek układu immunologicznego stosowano zarówno szczepy *S. enterica* sv. Typhimurium jak i Enteritidis zmutowane w genach kodujących białka regulatorowe (Δ phoPQ, Δ crp Δ cya), białka szlaków syntezy związków aromatycznych (Δ aroA) czy białka szoku cieplnego (Δ htr). Do konstrukcji tego rodzaju prototypów szczepionek podjednostkowych wykorzystano następujące białka *Campylobacter*: Peb1A (Cj0921c), CjaA (Cj0982c), Pal (Cj0113), Cj0420 i bakterioferytynę (Cj1534c) (Tab. II).

Białko Peb1A jest jednym z ważnych czynników wirulencji *C. jejuni*. Początkowo zostało zidentyfikowane jako adhezyna. Inaktywacja kodującego go genu *cj0921c* powodowała ok. 100-krotne obniżenie poziomu adhezji zmutowanego szczepu *C. jejuni* do komórek eukariotycznych i wpływała na kolonizację jelita myszy [36]. Białko Peb1A pełni w komórce *C. jejuni* także inną funkcję. Leon-Kempis-Medel i wsp. [24] wykazali, że Peb1A bierze udział w transporcie do wnętrza komórki bakteryjnej dwóch aminokwasów: glutamianu i asparagianu. Badania wykazały, że białko to stanowi składnik wiążący ligand systemu transportu typu ABC i jest niezbędne dla *C. jejuni* do wykorzystania tychże aminokwasów jako źródła węgla. Warto podkreślić, że transport aminokwasów jest niezwykle ważny w fizjologii komórek *C. jejuni*. Mikroorganizm ten nie posiada genu kodującego 6-fosfofruktokinazę – enzymu niezbędnego w katabolizmie glukozy, stąd aminokwasy *in vivo* stanowią dla *C. jejuni* główne źródło węgla i energii [15, 44, 47]. Białko Peb1A w komórkach *C. jejuni* zlokalizowane jest głównie w peryplazmie, jednakże odnajdywane było także na powierzchni komórki

Tabela II

Rodzaje testowanych szczepionek anty-*Campylobacter* [19]

Rodzaj szczepionki	Skład	Droga podania	Model	Efekt szczepienia
Szczepionki CWC				
<i>C. jejuni</i> 81-176	komórki inaktywowane formaliną	doustna	fretki	protekcja 40-89%
<i>C. jejuni</i> FIMCB	komórki inaktywowane formaliną	doustna	kurczęta	protekcja 16-93%
Campyvax®	komórki przygotowane wg <i>Nutriment Signal Technology</i>	doustna	ludscy ochotnicy	III faza kliniczna (wyniki niedostępne)
Szczepionki podjednostkowe				
rekombinowane białka	oczyszczone z komórek <i>E. coli</i> rekombinowane białka tj. FlaA-MBP, LivK, Cj1643, Cj0092, Cj0420, FlaC, FspA1, FspA2	donosowa lub podskórna	myszy	redukcja kolonizacji; protekcja w zależności od użytego białka: 17-89%
koniugaty polisacharydowe	CPS-CRM: polisacharyd otoczkowy <i>C. jejuni</i> 81-176 skoniugowany z inaktywowaną toksyną błoniczą	podskórna	myszy; małpy (<i>Aotus nancymae</i>)	brak objawów chorobowych przy jednoczesnej kolonizacji
szczepy <i>S. enterica</i> jako nośniki antygenów <i>Campylobacter</i>	białka Peb1A, Pal, CjaA, Cj420 produkowane w atenuowanych komórkach <i>S. enterica</i>	doustna	myszy; kurczęta	redukcja kolonizacji

[4, 24]. Ze względu na różną lokalizację Peb1A może pełnić w komórce podwójną rolę tj. adhezyny i białka wiążącego ligand.

Szczepki *S. Typhimurium* produkujące antygen Peb1A zostały skonstruowane przez amerykańską firmę biotechnologiczną AVANT Immunotherapeutics [42]. W tym celu fragmenty genu *cj0921c* (kodujące białko Peb1A bez sekwencji sygnałnej) sklonowano w trzech różnych plazmidach serii *Asd*⁺ i wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* Δ *phoPQ*. W dwóch pierwszych przypadkach użyte wektory zapewniały wewnątrzkomórkową produkcję białka. Plazmidy te różniły się jedynie liczbą kopii. Pierwszy posiadał *ori* replikacji pBR, drugi zaś dwa systemy replikacji: pSC101 i indukowalny *in vivo* system replikacji pUC. Trzeci z użytych wektorów zapewniał zaś sekrecję antygeny do środowiska za pomocą systemu transportu hemolizyny. Skonstruowanymi prototypami szczepionek produkującymi antygen Peb1A immunizowano doustnie myszy BALB/c. Pomimo, iż analizy Western blot w surowicy szczepionych zwierząt, wykazały indukcję produkcji specyficznych przeciwciał anty-Peb1A klasy IgG, immunizacja nie chroniła myszy przed zakażeniem pałeczkami *C. jejuni*.

Antygen CjaA (Cj0982c) został zidentyfikowany przez naszą grupę badawczą jako białko silnie reagujące z przeciwciałami anty-*Campylobacter* [35]. CjaA, podobnie jak Peb1A, jest zewnątrzkomórkowym białkiem *C. jejuni*, będącym składnikiem systemu transportu typu ABC, niezbędne w transporcie aminokwasów. Analiza krystalograficzna białka wykazała, że posiada ono silne powinowactwo do cysteiny [28]. Ze względu na fakt, iż ekspresja genu *cjaA* wrasta w warunkach obniżonego dostępu żelaza a także na podłożu stałym, jego produkt może brać udział w procesach kolonizacji i wirulencji [16,38]. Dodatkowo wykazano, iż białko CjaA występuje w większej ilości w komórkach świeżych klinicznych izolatów niż w komórkach wielokrotnie pasażowanych szczepów laboratoryjnych (4). Białko CjaA zostało także zidentyfikowane jako rozpoznawane przez przeciwciała matczyne, chroniące kurczęta przez pierwsze tygodnie życia przed zakażeniem *C. jejuni* [40].

W celu oceny potencjału protekcyjnych białka CjaA w Zakładzie Genetyki Bakterii UW skonstruowano szczep *S. Typhimurium* Δ *crp* Δ *cya* produkujący antygen [50]. Gen *cjaA* sklonowano do wysokokopijnego plazmidu *Asd*⁺ i wprowadzono do komórek nośnika zawierającego dodatkowo chromosomową delecję genu *asd*. Skonstruowanym prototypem szczepionki immunizowano kurczęta dwukrotnie w 1-szym i 14-tym dniu życia. Przeprowadzone eksperymenty wykazały indukcję przeciwciał anty-*Campylobacter* klasy IgY (IgG) w surowicy oraz sIgA w śluzie jelitowym szczepionych kurcząt. Uodpornianie kurcząt skonstruowanym prototypem szczepionki prowadziło także do obniżenia poziomu kolonizacji jelita ptaków przez heterologiczny szczep *C. jejuni* aż o 6 rzędów wielkości.

Skuteczność zastosowania antygeny CjaA potwierdziły też eksperymenty z użyciem innego atenuowanego szczepu *S. Typhimurium* uszkodzonego w szlakach syntezy aminokwasów aromatycznych [2]. W tychże badaniach gen *cjaA* sklonowano na plazmidzie pod kontrolą indukowalnego *in vivo* promotora *nirB* w fuzji transkrypcyjnej z fragmentem DNA kodującym C-terminalny fragment toksyny tężca. Plazmid zawierający gen *cjaA* wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* Δ *aroA*, po czym dwukrotnie szczepiono nim kurczęta. Eksperyment ochronny wykazał obniżenie poziomu kolonizacji ptaków o 1,4 rzędu wielkości w 3. i 4. tygodniu od zakażenia pałeczkami *C. jejuni*. Analiza odpowiedzi immunologicznej wykazała, iż protekcja związana jest ściśle z indukcją specyficznych przeciwciał zarówno klasy IgY jak i IgA rozpoznających białko CjaA. Plazmid zawierający gen *cjaA* wprowadzono także do innych atenuowanych szczepów *S. Typhimurium* tj. Δ *spaS* i Δ *ssaU*. Zmiana rodzaju atenuacji komórek nośnika przyczyniła się do zwiększenia efektu protekcyjnego, co prawdopodobnie wynikało z ich dłuższej przeżywalności w organizmie ptaków w porównaniu do stosowanego wcześniej szczepu Δ *aroA*.

W identyczny sposób badano także potencjał ochronny innych antygenów *C. jejuni* tj. Peb1A, GlnH i ChuA. Jedynie zastosowanie szczepu *S. Typhimurium* Δ *aroA* produkującego białko Peb1A obniżało poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt do poziomu obserwowanego w przypadku użycia antygeny CjaA.

Kolejnym antygenem *C. jejuni* zidentyfikowanym i testowanym przez naszą grupę badawczą było białko Pal (*peptidoglycan-associated lipoprotein*). Lipoproteina ta zwana także CjaD lub Omp18 zakotwiczona jest w błonie zewnętrznej komórek *C. jejuni*. Poprzez oddziaływanie z kompleksem białek Tol odpowiada za utrzymanie integralności osłon komórkowych [12]. Prawdopodobnie białko Pal jest niezbędne do przeżycia komórek *C. jejuni* – wielokrotne próby skonstruowania w naszym laboratorium mutanta delecyjnego w kodującym je genie *cj0113* kończyły się niepowodzeniem (dane niepublikowane). W celu oceny właściwości ochronnych antygeny gen *cj0113* sklonowano na wysokokopijnym plazmidzie *Asd*⁺ i wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* Δ *crp* Δ *cya* Δ *asd*. Białko w komórkach heterologicznego gospodarza lokalizowało się w osłonach komórkowych (głównie w błonie zewnętrznej). Badania na modelu kurzym wykazały, iż pomimo indukcji humoralnej odpowiedzi odpornościowej anty-*Campylobacter*, immunizacja nie prowadziła do obniżenia poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez pałeczki *C. jejuni* (dane niepublikowane).

Analizowano także przydatność do konstrukcji szczepionki białka Cj0420 (ACE393) zidentyfikowanego technikami proteomicznymi przez duńską firmę farmaceutyczną ACE BioSciences jako silny immunogen zlokalizowany na powierzchni komórek *C. jejuni* [37].

Analiza siewstwa przeprowadzona na modelu mysim potwierdziła potencjał ochronny białka Cj0420. Zwierzęta szczepione podskórnie oczyszczonym rekombinowanym białkiem były kolonizowane przez pałeczki *C. jejuni* znacznie rzadziej w stosunku do kontroli [39].

L a y t o n i wsp. [23] zastosowali odmienną strategię immunizacji, produkując w komórkach nośnika jedynie wybrane epitopy białek Pal, CjaA i Cj0420. W badaniach jako nośnika heterologicznych genów użyto szczepu *S. Enteritidis* Δ aroA Δ htr. DNA kodujący wybrane fragmenty białek Pal, CjaA i Cj0420 wprowadzono do chromosomu szczepu nośnikowego w obręb genu *lamB*, kodującego zewnątrzkomórkową porynę. Dzięki integracji DNA i uzyskanym fuzjom epitopy wybranych białek były prezentowane na powierzchni komórek *S. Enteritidis*. Użyty szczep nośnikowy oprócz antygeny w celu stymulacji komórkowej odpowiedzi odpornościowej produkował także peptyd CD154 (CD40L), będące ligandem czynnika TNF (*tumor necrosis factor*) [32]. Skonstruowane w powyższy sposób prototypy szczepionek podano *per os* kurczętom w dniu wyklucia. Ptaki zakażano pałeczkami *C. jejuni* 3 tygodnie później. Analiza odpowiedzi odpornościowej wykazały we wszystkich przypadkach indukcję w surowicy specyficznych przeciwciał klasy IgY (IgG). Najwyższe miano przeciwciał anty-*Campylobacter* uzyskano po immunizacji kurcząt szczepem produkującym epitop białka Pal. W tym przypadku widoczna była także indukcja wydzielniczych przeciwciał klasy IgA. Eksperyment ochronny na modelu kurzym wykazał, że szczepionka zawierająca epitop Pal obniża poziom kolonizacji kurcząt przez *C. jejuni* aż o 4 rzędy wielkości tj. poniżej poziomu kolonizacji wykrywalnego za pomocą stosowanej techniki qPCR – ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (*quantitative real-time PCR*). Produkcja w komórkach *S. Enteritidis* epitopów białek Cj0420 i CjaA także przyczyniła się do obniżenia poziomu kolonizacji kurcząt odpowiednio o ok. 1 i 2 rzędy wielkości.

5. Podsumowanie

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty na modelach zwierzęcych sugerują, iż z badanych dotąd antygenów *Campylobacter* białka CjaA i Peb1A mają największy potencjał ochronny, który powinien być wykorzystany w konstrukcji szczepionki anty-*Campylobacter* przeznaczonej dla drobiu. Niezbędne jest jednak kontynuowanie badań mających na celu identyfikację nowych skutecznych antygenów – białek konserwowanych w obrębie wielu serotypów, występujących w komórce w dużej ilości i indukujących silną odpowiedź odpornościową. Jednocześnie powinno się opracowywać nowe rodzaje strategii mające na celu wzmocnienie/modulację odpowiedzi odpornościowej kurcząt.

Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu MNiSW N N302 236838, decyzja 2368/B/P01/2010/38.

Piśmiennictwo

- Blaser M.J., Wells J.G., Feldman R.A., Pollard R.A., Allen J.R.: *Campylobacter* enteritis in the United States. A multicenter study. *Ann. Intern. Med.* **98**, 360–365 (1983)
- Buckley A.M., Wang J., Hudson D.L., Grant A.J., Jones M.A., Maskell D.J., Stevens M.P.: Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*, **28**, 1094–1105 (2010)
- Coker A.O., Isokpehi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., Obi C.L.: Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 237–244 (2002)
- Cordwell S.J., Len A.C., Touma R.G., Scott N.E., Falconer L., Jones D., Connolly A., Crossett B., Djordjevic S.P.: Identification of membrane-associated proteins from *Campylobacter jejuni* strains using complementary proteomics technologies. *Proteomics*, **8**, 122–139 (2008)
- de Zoete M.R., van Putten J.P., Wagenaar J.A.: Vaccination of chickens against *Campylobacter*. *Vaccine*, **25**, 5548–5557 (2007)
- EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA J.* **10**, 2597 (2012)
- EFSA: Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA J.* **8**, 1437–1526 (2010)
- Ekdahl K., Giesecke J.: Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, campylobacter and giardia infection as examples. *Euro. Surveill.* **9**, 6–9 (2004)
- Friis C., Ussery D.W. i wsp.: Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M1. *PLoS One*, **5**, e12253 (2010)
- Gallay A., Megraud F. i wsp.: *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 259–266 (2007)
- Gilbreath J.J., Cody W.L., Merrell D.S., Hendrixson D.R.: Change is good: variations in common biological mechanisms in the epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 84–132 (2011)
- Godlewska R., Wisniewska K., Pietras Z., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**, 1–11 (2009)
- Gripp E. i wsp.: Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics*, **12**, 584 (2011)
- Havelaar A.H. i wsp.: Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* **27**, 831–844 (2007)
- Hofreuter D., Novik V., Galan J.E.: Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe*, **4**, 425–433 (2008)
- Holmes K., Mulholland F., Pearson B.M., Pin C., McNicholl-Kennedy J., Ketley J.M., Wells J.M.: *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology*, **151**, 243–257 (2005)
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M.: Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* **117**, 237–257 (2007)
- Jacobs B.C., van Belkum A., Endtz H.P.: Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter* infection (w) *Campylobacter*, red.

- Nachamkin I., Szymanski C.M., Blaser M.J., Washington, D.C., 2008, s. 168–189
19. Jagusztyn-Krynicka E.K., Laniewski P., Wyszynska A.: Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert Rev. Vaccines*, **8**, 625–645 (2009)
 20. Janssen R., Krogfelt K.A., Cawthraw S.A., van Pelt W., Wagenaar J.A., Owen R.J.: Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 505–518 (2008)
 21. Joens L.A.: Reduction of *Campylobacter jejuni* in poultry using Cj1534 in an attenuated *Salmonella* vaccine. Med-Vet-Net Workpackage 34: Workshop on immunity to and vaccination against *Campylobacter jejuni* in chickens, Surrey, Wielka Brytania, 2009
 22. Kalischuk L.D., Inglis G.D., Buret A.G.: *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog.* **1**, 2 (2009)
 23. Layton S.L., Morgan M.J., Cole K., Kwon Y.M., Donoghue D.J., Hargis B.M., Pumford N.R.: Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 449–454 (2011)
 24. Leon-Kempis Mdel R., Guccione E., Mulholland F., Williamson M.P., Kelly D.J.: The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Mol. Microbiol.* **60**, 1262–1275 (2006)
 25. Liu X., Gao B., Novik V., Galan J.E.: Quantitative proteomics of intracellular *Campylobacter jejuni* reveals metabolic reprogramming. *PLoS Pathog.* **8**, e1002562 (2012)
 26. Mazi W., Senok A., Al-Mahmeed A., Arzese A., Bindayna K., Botta G.: Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of *tet(O)*-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry sources. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**, 82–84 (2008)
 27. Moore J.E. i wsp.: The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* **8**, 1955–1966 (2006)
 28. Muller A., Thomas G.H., Horler R., Brannigan J.A., Blagova E., Levdivok V.M., Fogg M.J., Wilson K.S., Wilkinson A.J.: An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Mol. Microbiol.* **57**, 143–155 (2005)
 29. Nachamkin I., Allos B.M., Ho T.: *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 555–567 (1998)
 30. Newell D.G., Fearnley C.: Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4343–4351 (2003)
 31. Newell D.G., Kruse H. i wsp.: Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, Suppl. 1, S3–15 (2010)
 32. O'Meara K.M., Kremer C.J., Layton S.L., Berghman L.R., Hargis B.M., Cole K.: Evaluation of recombinant *Salmonella* expressing CD154 for persistence and enhanced antibody response in commercial turkeys. *Poult. Sci.* **89**, 1399–1405 (2010)
 33. Olson C.K., Ethelberg S., van Pelt W., Tauxe R.V.: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations (w) *Campylobacter*, red. Nachamkin I., Szymanski C.M., Blaser M.J., AMS, Washington, D.C., 2008, s. 163–189
 34. Parkhill J., Barrell B.G. i wsp.: The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, **403**, 665–668 (2000)
 35. Pawelec D., Rozynek E., Popowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Cloning and characterization of a *Campylobacter jejuni* 72Dz/92 gene encoding a 30 kDa immunopositive protein, component of the ABC transport system; expression of the gene in avirulent *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **19**, 137–150 (1997)
 36. Pei Z., Buruoa C., Grignon B., Baqar S., Huang X.Z., Kopecko D.J., Bourgeois A.L., Fauchere J.L., Blaser M.J.: Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.* **66**, 938–943 (1998)
 37. Prokhorova T.A., Nielsen P.N., Petersen J., Kofoed T., Crawford J.S., Morszczek C., Boysen A., Schrotz-King P.: Novel surface polypeptides of *Campylobacter jejuni* as traveller's diarrhoea vaccine candidates discovered by proteomics. *Vaccine*, **24**, 6446–6455 (2006)
 38. Sampathkumar B., Napper S., Carrillo C.D., Willson P., Taboada E., Nash J.H., Potter A.A., Babiuk L.A., Allan B.J.: Transcriptional and translational expression patterns associated with immobilized growth of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **152**, 567–577 (2006)
 39. Schrotz-King P., Prokhorova T.A., Nielsen P.N., Crawford J.S., Morszczek C.: *Campylobacter jejuni* proteomics for new travellers' diarrhoea vaccines. *Travel. Med. Infect. Dis.* **5**, 106–109 (2007)
 40. Shoaf-Sweeney K.D., Larson C.L., Tang X., Konkel M.E.: Identification of *Campylobacter jejuni* proteins recognized by maternal antibodies of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6867–6875 (2008)
 41. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* **2**, 200 (2011)
 42. Sizemore D.R., Warner B., Lawrence J., Jones A., Killeen K.P.: Live, attenuated *Salmonella typhimurium* vectoring *Campylobacter* antigens. *Vaccine*, **24**, 3793–3803 (2006)
 43. Skanseng B., Trosvik P., Zimonja M., Johnsen G., Bjerrum L., Pedersen K., Wallin N., Rudi K.: Co-infection dynamics of a major food-borne zoonotic pathogen in chicken. *PLoS Pathog.* **3**, e175 (2007)
 44. Thompson S.A., Gaynor E.C.: *Campylobacter jejuni* host tissue tropism: a consequence of its low-carb lifestyle? *Cell Host Microbe*, **4**, 409–410 (2008)
 45. Tribble D.R. i wsp.: *Campylobacter jejuni* strain CG8421: a refined model for the study of campylobacteriosis and evaluation of *Campylobacter* vaccines in human subjects. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1512–1519 (2009)
 46. Tribble D.R. i wsp.: Diagnostic approach to acute diarrheal illness in a military population on training exercises in Thailand, a region of campylobacter hyperendemicity. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1418–1425 (2008)
 47. Velayudhan J., Kelly D.J.: Analysis of gluconeogenic and anaerobic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*, **148**, 685–694 (2002)
 48. Walker R.I.: Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. *Vaccine*, **23**, 3369–3385 (2005)
 49. Wright J.A., Grant A.J., Hurd D., Harrison M., Guccione E.J., Kelly D.J., Maskell D.J.: Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* *in vitro* growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology*, **155**, 80–94 (2009)
 50. Wyszynska A., Raczko A., Lis M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, **22**, 1379–1389 (2004)

KONSTRUKCJA SZCZEPIONEK PODJEDNOSTKOWYCH Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK *SALMONELLA ENTERICA* JAKO NOŚNIKA HETEROLOGICZNYCH GENÓW

Paweł Łaniewski¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. *Salmonella* jako idealny nośnik heterologicznych antygenów. 2. Atenuacja komórek *S. enterica*. 3. Stabilność utrzymania transgenu. 4. Poziom ekspresji transgenu. 5. Lokalizacja antygeny a typ odpowiedzi immunologicznej. 6. Podsumowanie

Subunit vaccine construction using *Salmonella enterica* cells as a carrier of heterologous genes

Abstract: *Salmonella enterica* strains are widely employed as a live delivery vector for subunit vaccine construction. Vaccine strains must be safe but still immunogenic; therefore, it is crucial to obtain a proper balance between the attenuation and the reactogenicity of the constructed strains. *Salmonella* strains used in immunoprophylaxis are mainly constitutively disrupted in genes involved in auxotrophy, virulence or regulation. A novel promising concept of the *Salmonella*-based vaccine design is a regulated delayed attenuation *in vivo* combined with a delayed antigen expression system. Using this approach bacteria display features of a wild-type strain at the time of oral vaccination to effectively colonize the lymphoid tissue and the fully attenuated phenotype after host tissue colonization. Expression of heterologous genes in *Salmonella* cells is mainly achieved by introducing recombinant plasmids harboring gene of interest. Alternatively, a transgene can be integrated into a chromosomal DNA. Diverse strategies were developed to control plasmid maintenance and foreign gene expression. Among them the most frequently used are the balanced-lethal and toxin-antidote systems or operator-repressor titration technology. Overproduction of a recombinant protein often causes a metabolic burden in vaccine cells resulting in the loss of their viability. To overwhelm the problem, the transgene expression is kept under control of an *in vivo* inducible promoter or a promoter which activity is regulated by appropriate small molecules. Alternatively, plasmids with a regulated copy number or a delayed antigen synthesis system have been employed by various research groups. Localization of an antigen in a carrier cell is also critical for the strength and type of immune response. A programmed lysis of carrier cells is used to deliver the antigen to host immune cells. Moreover, *Salmonella* is used to carry DNA vaccines. Here, we review the latest strategies in the design of *Salmonella*-based subunit vaccines.

Contents: 1. *Salmonella* as a perfect carrier of heterologous antigens. 2. Attenuation of *S. enterica* cells. 3. Transgene stability. 4. Transgene expression level. 5. Antigen localization and the type of immune response. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: atenuacja, nośnik, *Salmonella*, szczepionka podjednostkowa

Key words: attenuation, carrier, *Salmonella*, subunit vaccine

1. *Salmonella* jako idealny nośnik heterologicznych antygenów

Bakterie *Salmonella enterica* posiadają wiele cech predysponujących je do użycia jako nośnik heterologicznych antygenów w konstrukcji szczepionek podjednostkowych. Mikroorganizmy tego gatunku w zależności od serotypu wywołują u ludzi różne choroby. *S. enterica* sv. Typhi (*S. Typhi*) jest czynnikiem etiologicznym duru brzuszego, natomiast infekcje ludzi *S. enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*) oraz *S. enterica* sv. Enteritidis (*S. Enteritidis*) są często przyczyną tzw. zatruc pokarmowych [53]. Pomimo, iż szczepy *S. enterica* są wysoce wirulentne, wystarczy inaktywacja kilka genów aby uzyskać wystarczająco bezpieczny poziom atenuacji komórek patogenu. Większość narzędzi genetycznych używanych do badań na modelowym organizmie jakim jest *Escherichia coli*, ze względu na bliskie pokrewieństwo obu bakterii, można zastosować także do manipulacji genetycznych komórek *Salmonella*. Szczepionki podjednostkowe skonstruowane w opar-

ciu o atenuowane szczepy *Salmonella* silnie stymulują zarówno odpowiedź humoralną jak i komórkową. Dodatkowo podane drogą doustną lub donosową indukują mechanizmy odpornościowe w błonach śluzowych. Ten łatwy i nie wymagający użycia strzykawek sposób podania szczepionki umożliwia w przypadku zwierząt jednoczesną immunizację całych stad poprzez rozpylenie bakterii lub dodanie ich do wody pitnej. Kluczową kwestią są też niskie koszty produkcji tego typu szczepionek, a także możliwość liofilizacji i przechowywania preparatu w temperaturze pokojowej, co jest niesłychanie istotną zaletą szczepionki w przypadku użycia jej w krajach rozwijających się.

2. Atenuacja komórek *S. enterica*

Obecnie na rynku znajdują się dwa licencjonowane rodzaje szczepionek przeciwko durowi brzuszemu. Tylko jedna z nich – o nazwie handlowej Vivotif® (Berna Biotech AG) – zawiera żywe komórki *S. Typhi* Ty21a.

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

Szczep ten został otrzymany w latach 70. ubiegłego wieku w wyniku niespecyficznego chemicznego mutageny wirulentnych komórek szczepu *S. Typhi* Ty2 przy użyciu nitrozoguanidyny [27]. Początkowo został scharakteryzowany jako mutant w genie *galE*, kodującym 4-epimerazę UDP-galaktozową – enzym odpowiedzialny za wytwarzanie pełnego lipopolisacharydu (LPS). Dalsze badania wykazały, że nie produkuje on także antygeny Vi i posiada w genomie ponad 30 innych mutacji odróżniających jego materiał genetyczny od wyjściowego szczepu Ty2 [28, 48]. Szczepionka ta jest dobrze tolerowana i bezpieczna w użyciu. W ciągu 25 lat zaszczepiono nią ponad 200 milionów ludzi i obserwowano stosunkowo niewielką liczbę odczynów poszczepiennych. Jednakże nie jest ona całkowicie skuteczna i w celu zapewnienia długotrwałego efektu ochronnego musi być podawana doustnie co najmniej w 3 dawkach.

Drugą dostępną szczepionką – Typhim Vi® (Sanofi Pasteur) – zawiera oczyszczony polisacharyd otoczkowy Vi, który jest charakterystyczny dla serowarów Typhi, Paratyphi C i Dublin [30]. Szczepionka ta podawana jest domięśniowo jednokrotnie, gdyż dawki przypominające, tak jak w przypadku stosowania innych szczepionek polisacharydowych, nie wzmacniały odpowiedzi immunologicznej. Podobnie jak Vivotif® szczepionka ta charakteryzuje się tylko 55–70% skutecznością. Dodatkowo nie wykazuje efektu ochronnego u dzieci poniżej 2 roku życia [42,50]. Ta jej wada zostanie prawdopodobnie w najbliższym czasie przezwyciężona poprzez wprowadzenie na rynek szczepionek zawierających polisacharyd Vi skoniugowany z białkiem nośnikowym tj. nietoksyczną rekombinowaną egzotoksyną *A Pseudomonas aeruginosa* (szczepionka Vi-rEPA) lub nieaktywną toksyną błoniczą CRM₁₉₇ (*cross reacting material*). Szczepionka Vi-CRM₁₉₇, opracowana przez firmę Novartis, zawiera jako białko nośnikowe CRM₁₉₇, aktualnie już licencjonowany do stosowania w szczepionkach dla ludzi preparat, oraz polisacharyd Vi otrzymany ze szczepu *Citrobacter freundii* WR7011. Polisacharyd Vi *C. freundii* jest strukturalnie zbliżony i immunologicznie nierozróżnialny od Vi *S. Typhi* [54, 63, 71, 76].

Rozwój techniki inżynierii genetycznej oraz dokładne poznanie mechanizmów patogenezы *S. enterica* pozwoliło na skonstruowanie wielu awirulentnych szczepów zawierających w przeciwieństwie do *S. Typhi* Ty21a kilka zdefiniowanych mutacji. Najważniejsze prototypy szczepionek przeciwko durowi brzuszemu będące obecnie w fazie badań klinicznych przedstawiono w Tab. I. Jednocześnie szczepy te są wykorzystywane jako nośniki heterologicznych antygenów m.in. ureazy *Helicobacter pylori* (Ty800) [15], C-terminalnego fragmentu toksyny tężca [69], podjednostki PA83 toksyny węgliką (CVD 908-*htrA*) [21] czy antygenów wirusa HPV (*human papilloma virus*) (Ty21a, CVD 908-*htrA*, Ty800 [18] w celu konstrukcji biwalentnych szczepionek.

Najczęściej wprowadzanymi zmianami w chromosomie powodującymi utratę wirulencji przez komórki *S. enterica*, zarówno *S. Typhi* jak i *S. Typhimurium*, były delekcje następujących genów:

- *pur*, *aro*, *gua* – kodujących białka niezbędne w biosyntezie puryn, aminokwasów aromatycznych i guanidyny (mutacje auksotroficzne);
- *htrA* – kodującym peryplazmatyczną proteazę serynową, indukowaną w warunkach stresowych i niezbędną dla komórek *S. enterica* do przetrwania w makrofagach;
- *ssaV*, *cdt* – kodujących czynniki wirulencji (*ssaV* koduje białko strukturalne budujące aparat sekrecyjny typu III wyspy patogenności SPI-2 a *cdt* białko warunkujące kolonizację głębiej położonych tkanek);
- *phoPQ*, *cya*, *crp*, *fur*, *rpoS*, *rhoE*, *rfaH*, *dam* – kodujących białka regulatorowe, alternatywne czynniki σ , antyterminatory transkrypcji lub metylazy DNA;
- *galE*, *pml*, *rfaH*, *rfc* – kodujących białka niezbędne w biogenezie lipopolisacharydu.

Wprowadzenie wyżej wymienionych mutacji w szczepach *S. enterica* używanych jako nośniki heterologicznych genów powinno zapewniać odpowiedni poziom atenuacji komórek. Ważne jest, aby skonstruowany szczep *Salmonella* był jednocześnie bezpieczny w użyciu tzn. nie wywoływał objawów poszczepiennych nawet u osób z osłabionym układem immunologicznym a jed-

Tabela I
Obecnie badane szczepionki nowej generacji przeciwko durowi brzuszemu

Nazwa	Genotyp	Faza badań	Piśmiennictwo
CVD 908- <i>htrA</i>	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>aroC</i> Δ <i>aroD</i> Δ <i>htrA</i>	II	[70]
CVD 909 (HoloVax-Typhoid®)	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>aroC</i> Δ <i>aroD</i> Δ <i>htrA</i> P _{tac} <i>viaB</i> (produkujący konstytutywnie antygen Vi)*	II	[70]
M01ZH09	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>aroC</i> Δ <i>ssaV</i>	II	[44, 75]
Ty800	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>phoPQ</i>	I	[31]

* Geny kodujące antygen Vi znajdują pod kontrolą ściśle regulowanego promotora. Ich ekspresja jest indukowana jedynie w środowisku zewnątrzkomórkowym, natomiast gdy komórki *Salmonella* znajdują się wewnątrz makrofagów i komórek dendrytycznych geny kodujące białka niezbędne do produkcji antygeny Vi nie są wyrażane. W celu stymulacji odpowiedzi immunologicznej wobec antygeny Vi, w szczepie CVD 909 *viaB* sklonowano pod kontrolą konstytutywnego promotora *tac*.

nocześnie był silnie immunogeny w celu zapewnienia długotrwałego efektu ochronnego (najlepiej po zażyciu już jednej dawki preparatu). Przykładem nieprawidłowego zbalansowania poziomu atenuacji i immunogenności jest aktualnie używany jako szczepionka przeciwko durowi brzuszemu szczep *S. Typhi* Ty21. Jego niska skuteczność prawdopodobnie wynika z nadatenuacji, braku aktywnego genu *rpoS* kodującego jeden z alternatywnych czynników σ polimerazy RNA. Z drugiej strony szczepy zawierające unieczynnione pojedyncze geny lub szlaki metaboliczne niezbędne do infekcji komórek gospodarza mogą wykazywać nadal zbyt wysoki poziom wirulencji. Szczep CVD 908 skonstruowano mutując wirulentne komórki *S. Typhi* Ty2 w genach *aroC* i *aroD*, których produkty są niezbędne do biosyntezy aminokwasów aromatycznych [70]. W rezultacie szczep ten nie namnaża się wewnątrz komórek eukariotycznych, jednak jest w stanie przetrwać wewnątrz ich na tyle długo, aby zaindukować silną odpowiedź immunologiczną. Badania kliniczne na ludzkich ochotnikach wykazały, że szczep CVD 908 rzeczywiście indukuje wysoki poziom przeciwciał anty-LPS klasy IgG w surowicy jak i stymuluje powstawanie limfocytów B produkujących przeciwciała anty-LPS klasy IgA już po zażyciu pojedynczej dawki. Jednak szczepionka była dobrze tolerowana przez pacjentów tylko w przypadku doustnego podania pojedynczej dawki zawierającej 5×10^4 lub 5×10^5 CFU. Podanie wyższych dawek powodowało u pacjentów asymptomatyczną poszczepienną bakteremię. Okazało się, że dopiero wprowadzenie dodatkowej mutacji w genie *htrA*, zwiększającej wrażliwość komórek *Salmonella* na stres oksydacyjny, pozwoliło na osiągnięcie odpowiedniego poziomu atenuacji. Badania wykazały, że w ten sposób skonstruowany szczep CVD 908-*htrA* w porównaniu do poprzedniego nadal jest silnie immunogeny i nie jest odnajdywany we krwi pacjentów, nawet przy zastosowaniu wysokich dawek preparatu (tj. 5×10^9 CFU). Przykład ten ilustruje jak ważne jest w konstrukcji awirulentnych szczepów *Salmonella* odpowiednie zbilansowanie poziomu atenuacji i immunogenności komórek. Jedną z przyczyn utrudniających otrzymanie odpowiednio atenuowanych i wysoce immunogennych szczepów *S. Typhi* jest brak modelu zwierzęcego do badań, ze względu na silny tropizm gatunkowy *S. Typhi*. *S. Typhi* jest patogenem wyłącznie ludzi. Początkowe badania oceniające atenuację i immunogenność zmienionych genetycznie szczepów *Salmonella* przeprowadzane są z wykorzystaniem *S. Typhimurium* na modelu mysim. Infekcja myszy *S. Typhimurium* wywołuje u tych zwierząt objawy chorobowe podobne do ludzkiego duru brzuszego. Jednak w większości przypadków wprowadzenie identycznych mutacji do genomu *S. Typhi* skutkuje niecałkowitą ich atenuacją i niemożliwym do zaakceptowania poziomem reaktogenności lub też ich nadatenuacją. Trzeba

pamiętać, że u ludzi te dwa serotypy charakteryzują się innym przebiegiem infekcji, zakażenie *S. Typhi* wywołuje ogólnoustrojową infekcję, a zakażenie *S. Typhimurium* infekcję lokalną ze stanem zapalnym. Jednym z przykładów są podane wyżej badania dotyczące serii szczepów *S. Typhi* CVD, innym badania mające na celu skonstruowanie szczepów *S. Typhi* RASTyV (*recombinant attenuated S. Typhi vaccine*). W tym drugim przypadku wprowadzenie na plazmidzie genu *rpoS*, który był nieaktywny w wyjściowym szczepie *S. Typhi* Ty2 w znaczący sposób zwiększyło skuteczność immunizacji [66]. Należy też wnikliwie przeanalizować fenotypy szczepów wyjściowych stosowanych do otrzymania wersji atenuowanych. Znaczące różnice w genomach występujące nie tylko pomiędzy różnymi serotypami, ale także pomiędzy szczepami tych samych serotypów *Salmonella*, skutkują różnym rodzajem i różnym poziomem odpowiedzi immunologicznej [10, 66].

Optymalnie atenuowane szczepy *S. Typhi* lub *S. Typhimurium* wykorzystane jako nośniki heterologicznych antygenów mogą nie funkcjonować idealnie z powodu zaburzenia metabolizmu komórek nośnika związanego z ekspresją transgeny. W wyniku nadprodukcji heterologicznego białka komórki *Salmonella* stają się często nadatenuowane i zbyt słabo immunogenne. Nowatorskim rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie strategii „regulowanej opóźnionej atenuacji *in vivo*” (*regulated delayed attenuation in vivo*) [12]. Klasyczna konstrukcja awirulentnych szczepów *Salmonella* polegała na ich konstytutywnej atenuacji, nowa metoda opiera się zaś na warunkowej atenuacji. Szczep skonstruowany według tej metody w momencie przygotowania preparatu i szczepienia posiada dziki fenotyp, dzięki czemu nie ma obniżonego potencjału kolonizacyjnego i potrafi spenetrować głębokie warstwy tkanki GALT oraz odpowiednie narządy limfatyczne immunizowanego gospodarza. Dopiero w momencie oddziaływania z komórkami prezentującymi antygen (tj. makrofagami czy komórkami dendrytycznymi) komórki *Salmonella* ulegają atenuacji.

Konstrukcję szczepu o opóźnionej atenuacji można osiągnąć na kilka sposobów. Jednym z nich jest delecja genu *pmi*, kodującego izomerazę mannozo-6-fosforanową [13]. Enzym ten, katalizujący reakcję konwersji fruktozo-6-fosforanu do mannozo-5-fosforanu, jest niezbędny do syntezy pełnego antygeny O lipopolisacharydu. Komórki mutanty w genie *pmi* hodowane w obecności mannozy syntetyzują pełen LPS (*smooth LPS*), jednak po skolonizowaniu tkanek gospodarza po 7–8 podziałach tracą antygen O, stając się bardziej podatne na fagocytozę i działanie układu dopełniacza. W celu zapewnienia wykorzystania mannozy przez komórki podczas hodowli *in vitro* tylko do syntezy LPS dodatkowo zinktywowano geny *gmd-fcl*. Produkty tych genów umożliwiają przekształcenie GDP-mannozy

w GDP-fukozę i syntezę polisacharydowego kwasu kolonowego (*colanic acid*). Wykazano, że mutacja obniża także zdolność do tworzenia biofilmu i kolonizację powierzchni kamieni żółciowych, jednak nie ma wpływu na immunogenność szczepu.

Inną strategią uzyskania opóźnionej atenuacji jest konstrukcja warunkowych mutantów z użyciem kasety *araC P_{BAD}* zawierającej regulator i promotor arabinozowy [12]. Delecja w chromosomie nukleotydowej sekwencji promotorowej wybranego genu lub genów i zastąpienie jej kasetą arabinozową skutkuje transkrypcją genu/ów tylko w obecności arabinozy. Po skolonizowaniu tkanek gospodarza, ekspresja tychże genów ze względu na brak induktora, zostaje zahamowana.

Badania z użyciem szczepu *S. Typhimurium* o opóźnionej atenuacji produkującego antygen PspA *Streptococcus pneumoniae* na modelu mysim wykazały, że kolonizuje on wątrobę i śledzionę z 10-krotnie wyższą częstością niż szczepy atenuowane w standardowy sposób [51]. Użyty w tych badaniach szczep zawierał wiele zmian w chromosomie, a jego opóźniona atenuacja wynikała z delecji genu *pmi* oraz wprowadzeniu kaset arabinozowych powyżej genów *fur* lub *i crp*, kodujące istotne dla wirulencji białka regulatorowe. Immunizacja myszy szczepem o opóźnionej atenuacji indukowała wyższy poziom specyficznych przeciwciał anty-PspA klasy IgG oraz wyższy poziom cytokin charakterystycznych zarówno dla odpowiedzi immunologicznej typu Th1 jak i Th2 tj. IFN- γ i IL-4. Co więcej jego zastosowanie prowadziło do podwyższenia skuteczności szczepionki z 21% aż do 71–86% (odsetek przeżycia myszy zakażanych wirulentnym szczepem *S. pneumoniae*). Wyniki eksperymentu potwierdziły, że rodzaj atenuacji szczepu nośnikowego ma ogromny wpływ na immunogenność heterologicznego antygeny.

3. Stabilność utrzymania transgeny

Najczęstszym narzędziem wykorzystywanym do ekspresji heterologicznych genów w komórkach bakteryjnych są rekombinowane plazmidy. W celu zapewnienia ich stabilnego utrzymania w komórce w warunkach *in vitro* stosuje się antybiotykową presję selekcyjną. Jednakże w trakcie immunizacji w warunkach *in vivo* plazmid może być spontanicznie tracony, ponieważ ekspresja heterologicznego genu zlokalizowanego na plazmidzie stanowi spore obciążenie metaboliczne dla komórek nośnikowych. Komórki w środowisku pozbawionym presji selekcyjnej mogą utracić plazmid i zdobyć przewagę w populacji, co niewątpliwie drastycznie obniżałoby efektywność immunizacji. Ze względów bezpieczeństwa odpowiednie agencje wprowadziły także regulacje zabraniające używania kaset niosących geny warunkujące antybiotykooporność w konstruk-

cji szczepionek przeznaczonych dla ludzi lub zwierząt. Dodatkowo stosowane do konstrukcji szczepów szczepionkowych rekombinowane plazmidy powinny być niekonjugacyjne, niemobilizowane i charakteryzować się wąskim zakresem gospodarza. Uniemożliwia to przeniesienie transgeny do innych bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów.

W celu stabilnego utrzymywania plazmidów w komórkach *Salmonella* bez konieczności stosowania antybiotykowej presji selekcyjnej skonstruowano tzw. „*balanced-lethal host-vector system*” lub „*conditional-lethal system*”. W układach tych szczep nośnikowy zawiera chromosomową delecję genu metabolizmu podstawowego (*house-keeping gene*). Mutacja (najczęściej warunkująca auksotrofizm) jest komplementowana przez funkcjonalny allel genu zlokalizowany na rekombinowanym plazmidzie; tak więc, do przeżycia komórek niezbędne jest posiadanie plazmidowej kopii genu. Komórki, który utracą plazmid są eliminowane z populacji w wyniku zaburzenia prawidłowego metabolizmu. Jednym z genów wykorzystanych z powodzeniem w konstrukcji takiego układu jest gen *asd*, kodujący dehydrogenazę semialdehydu asparaginianowego – enzymu niezbędnego do biosyntezy m.in. kwasu diaminopimelinowego, składnika peptydoglikanu [11]. Plazmidy zawierające sklonowany i zoptymalizowany pod kątem poziomu ekspresji gen *asd* wykorzystano z powodzeniem do produkcji w komórkach *S. Typhimurium* m.in. antygenów PspA i PsaA *S. pneumoniae* [40, 80], PsaA i LcrV *Yersinia pestis* [4, 72, 73], CjaA *Campylobacter jejuni* [84] czy też ESAT-6 i CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* [38].

Inne geny wykorzystane do konstrukcji tego typu systemu to m.in. *dadB* i *murA* kodujące także enzymy niezbędne do syntezy peptydoglikanu, odpowiednio racemazę alaninową i transferazę enoilopirogronianową [78], *thyA*, kodujący syntezę tymidylanową niezbędną w biosyntezie tymidyny [3] czy też *ssb* (*single-stranded binding protein*) kodujący białko biorące udział w procesach replikacji, rekombinacji i naprawy DNA [22].

Inną strategią mającą na celu zapobieganie utracie plazmidów jest wykorzystanie występującego naturalnie w komórkach bakteryjnych mechanizmu posegregacyjnej eliminacji bezplazmidowych komórek (*post-segregational killing system*) *hok-sok* [20]. Ten system addycyjny zwany systemem „trucizna-antidotum” składa się z trzech genów: *hok* (*host killing*), *mok* (*mediation of killing*) i *sok* (*suppression of killing*). W komórkach zawierających plazmid transkrypcji ulegają gen *hok*, kodujący białko o toksycznych dla komórki właściwościach (trucizna) jak i gen *sok*, kodujący krótki antysensowny RNA (antidotum). Oddziaływanie RNA *sok* z transkryptem mRNA zachodzących na siebie genów *mok-hok* prowadzi do degradacji powstałej dwuniciowej struktury przez RNazę III, co uniemożliwi produkcję toksyny. W przypadku utraty przez komórkę plazmidu zawiera

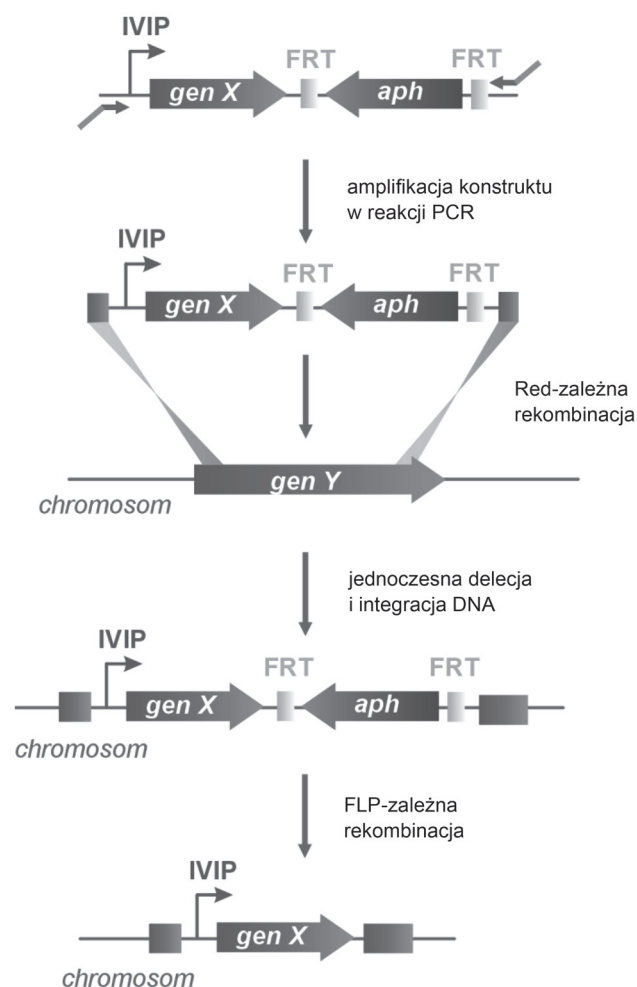
ona otrzymane w wyniku podziału zarówno cząsteczki mRNA trucizny jak i antidotum. Antysensowny RNA *sok* w przeciwieństwie do mRNA *mok-hok* jest mniej stabilny i szybciej ulega degradacji. W ten sposób w komórce gen *hok* ulega transkrypcji, syntetyzowana toksyna depolaryzuje błonę cytoplazmatyczną, co prowadzi do śmierci komórki [26]. System ten wykorzystano m.in. w badaniach przedklinicznych do stabilnego utrzymywania przez komórki *S. Typhi* CVD 908-*htrA* plazmidu kodującego podjednostkę toksyny węgla PA83 w fuzji z białkiem ClyA [19].

Ciekawym rozwiązaniem jest także strategia utrzymywania plazmidów opierająca się na oddziaływaniu sekwencji operatorowych *lacO* z represorem LacI tzw. ORT („operator-repressor titration technology”) [24]. W celu jej zastosowania niezbędna była konstrukcja szczepu *S. Typhimurium* zawierającego zlokalizowany na chromosomie gen metabolizmu podstawowego tj. *dapD*, kodujący enzym niezbędny do syntezy lizyny, pod kontrolą promotora laktozowego. Wprowadzenie do komórek rekombinowanego plazmidu zawierającego sekwencje operatora *lacO* powoduje wysycenie represora LacI, co umożliwi syntezę białka niezbędnego do przeżycia komórek. W przypadku utraty plazmidu, nadmiar produkowanego represora LacI blokuje syntezę białka DapD, co prowadzi do śmierci komórki. System ten został wykorzystany do konstrukcji szczepu *S. Typhimurium* produkującego antygen F1 *Y. pestis* [25]. Badanie na modelu mysim wykazało stabilne utrzymanie plazmidu, co przyczyniło się do uzyskania efekt protekcyjnego po jednokrotnym szczepieniu zwierząt. Ostatnio technologię tą z powodzeniem wykorzystano także do konstrukcji prototypu szczepionki DNA przeciwko prątkom gruźlicy [33]. Za pomocą mikroskopii immunofluorescencyjnej wykazano skuteczność systemu ORT w dostarczaniu heterologicznego DNA (tj. genu *mpt64 M. tuberculosis*) do wnętrza mysich makrofagów.

Alternatywnym sposobem utrzymywania transgeny w komórkach *Salmonella* jest integracja heterologicznego DNA do chromosomu szczepu nośnikowego. Niewątpliwą zaletą tej strategii jest możliwość jednoczesnej inaktywacji genu prowadzącej do atenuacji szczepu nośnikowego wraz z wprowadzeniem kasety ekspresyjnej. Integracja do DNA zapewnia wysoką stabilność utrzymania transgeny, gdyż geny zlokalizowane na chromosomie bardzo rzadko ulegają spontanicznym delecjom.

Do niedawna ta genetycznie skomplikowana metoda, opierająca się głównie na rekombinacji homologicznej Rec, wymagała przeprowadzenia wielu manipulacji *in vitro* oraz stosowania kaset niosących geny warunkujące antybiotykooporność. Opracowanie nowego narzędzia do konstrukcji mutantów wykorzystującego rekombinazę Red faga λ (*recombineering*) niewątpliwie ułatwi i przyspieszy konstrukcję szczepów zawierających

zintegrowany z chromosomem heterologiczny DNA [35]. System z użyciem fagowej rekombinazy pozwala na efektywniejsze i bardziej precyzyjne manipulowanie materiałem genetycznym *Salmonella*. W przeciwieństwie do bakteryjnego systemu rekombinacji Rec wymaga on jedynie krótkich nukleotydowych sekwencji homologicznych (30–50 pz). Daje też możliwość usunięcia kasety „antybiotykooporności” po selekcji mutantów, co jest istotnym elementem w konstrukcji szczepów szczepionkowych. Usunięcie niepożądanego nukleotydowej sekwencji DNA jest możliwe, dzięki wykorzystaniu aktywności enzymatycznej rekombinazy specyficznej co do miejsca FLP (tzw. flipazy) wycinającej dowolną nukleotydową sekwencję położoną między dwoma sekwencjami FRT (*FLP recombinase target*) o zgodnej orientacji. Użycie w konstrukcji mutantów kasety „antybiotykoopornościowej” oflankowanej sekwencjami FRT pozwala na jej skuteczne usunięcie za pomocą rekombinazy FLP. Poszczególne etapy opisanej wyżej metody integracji transgeny do chromosomalnego DNA przedstawia Rys. 1.



Rys. 1. Mechanizm integracji heterologicznego DNA do chromosomu *Salmonella* za pomocą systemu rekombinacji Red faga λ.

Opis w tekście. Objaśnienia: IVIP – promotor indukowalny *in vivo*; FLP – rekombinaza specyficzna co do miejsca (flipaza); FRT – sekwencja rozpoznawana przez flipazę; *aph* – gen oporności na kanamycynę.

Ze względu na fakt, iż w ten sposób wprowadzony gen posiada tylko jedną kopię w komórce ważne jest zapewnienie optymalnej produkcji heterologicznego białka w celu uzyskania odpowiedniej immunogenności [34].

4. Poziom ekspresji transgenu

Jak wspomniano wcześniej konstytutywna produkcja antygeny najczęściej z wysokokopijnego plazmidu powoduje zaburzenie metabolizmu komórki nośnika, co wpływa na infekcyjność szczepu *in vivo* i może prowadzić do obniżenia skuteczności immunizacji.

Jedną ze strategii ograniczającą ekspresję heterologicznych genów jest użycie promotorów indukowalnych *in vivo* – IVIP (*in vivo inducible promoter*) (Rys. 2). W tym przypadku antygen jest syntetyzowany przez komórki nośnika tylko w momencie oddziaływania z komórkami APC układu immunologicznego gospodarza. Do tej pory zastosowano promotory następujących genów *S. enterica* tj. *nirB*, *dmsA*, *pagC*, *spv*, *dps*, *phoP*, *ompC*, *htrA*, *groE*, *katG*, *sseA* czy *ssaG* [7].

Jednymi z najczęściej używanymi w konstrukcji szczepionek są promotory genów *pagC* i *ssaG*. Gen *pagC* koduje białko zlokalizowane w błonie zewnętrznej istotne dla komórek *S. enterica* do przetrwania wewnątrz makrofagów [55]. Natomiast białko SsaG stanowi składnik aparatu transportu typu III, kodowanego przez geny zlokalizowane na wyspie patogenności SPI-2. Promotory *pagC* i *ssaG* z powodzeniem wykorzystano do ekspresji heterologicznych genów, gdyż ulegają one indukcji w makrofagach, a w warunkach *in vitro* wykazują niski poziom ekspresji.

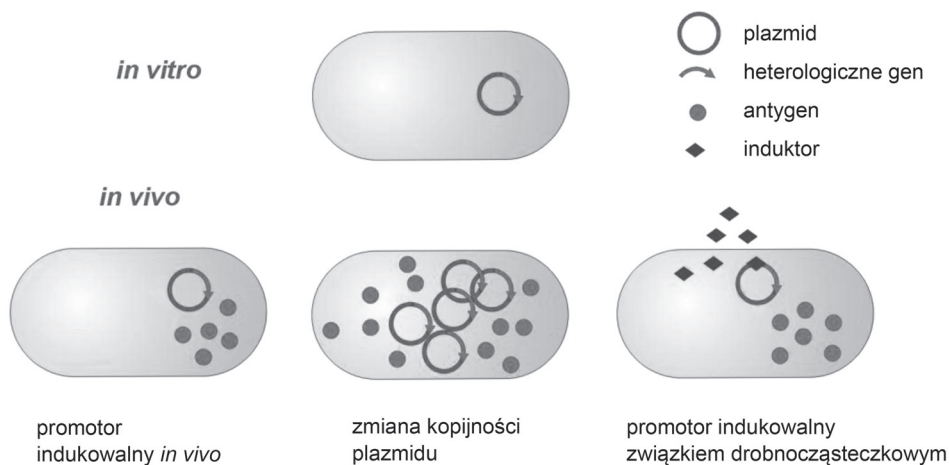
Wpływ indukcji produkcji antygeny tylko w warunkach *in vivo* na efektywność immunizacji badano z udziałem różnych promotorów wielokrotnie. Porównywano m.in. dwa regulowane przez białko FNR (*fuma-*

rate nitrate reduction) promotory *nirB* i *dmsA* użyte do ekspresji DNA kodującego C-fragment toksyny tężca [56]; promotor *nirB* i *htrA* zastosowane do ekspresji DNA kodującego C-fragment toksyny tężca [62]; promotor *nirB* ze sztucznie skonstruowanym podwójnym promotorem *nirB*-T7 użytym do ekspresji fuzji antygeny *Streptococcus mutans* z podjednostką B toksyny LT *E. coli* [64]; promotory *pagC* i *nirB* zastosowane do ekspresji epitopów białek wirusa TGEV (*transmissible gastroenteritis virus*) [9]. W większości przypadków ich zastosowanie zwiększa poziom odpowiedzi immunologicznej w stosunku do zastosowania promotorów aktywnych konstytutywnie, choć decyzja wyboru IVIP do kontroli konkretnego antygeny w konkretnym szczepie nośnikowym winna być dobrana eksperymentalnie.

Synteza owoalbuminy przez komórki *S. Typhimurium* Δ *sseC* (*SseC* – składnik kompleksu aparatu sekrecyjnego typu III SPI-2) w warunkach *in vivo*, wynikająca ze sklonowania heterologicznego genu na plazmidzie pod kontrolą promotora *sseA* (*SseA* – białko opiekuńcze systemu sekrecji typu III SPI-2), w porównaniu do konstytutywnej syntezy białka indukowała u myszy wyższy poziom specyficznych przeciwciał zarówno klasy IgG jak i IgA, ale także silniej stymulowała odpowiedź komórkową. Zastosowanie analogicznej produkcji antygeny p60 *Listeria monocytogenes* w tychże komórkach zapewniała wyższy poziom protekcji [35].

B u m a n n (2001) [cyt. wg. 7] wykazał zaś, że zarówno konstytutywna jak i regulowana (za pomocą promotora genu *pagC*) produkcja owoalbuminy przez komórki *S. Typhimurium* Δ *aroA* stymuluje u myszy podobny poziom odpowiedzi immunologicznej związany z limfocytami Th CD4⁺. Jednakże w przypadku produkcji białka z wykorzystaniem IVIP do stymulacji podobnego poziomu odpowiedzi komórkowej potrzebna była 1000-krotnie niższa dawka bakterii.

W przypadku transgenów zlokalizowanych na chromosomie zastosowanie konstytutywnych silnych pro-



Rys. 2. Strategie indukcji ekspresji heterologicznych genów w warunkach *in vivo* poprzez zastosowanie promotorów indukowalnych *in vivo*, zmiany kopijności plazmidu *in vivo* lub użycie odpowiedniego induktora ekspresji genu

motorów ma na celu zapewnienie wystarczającej ilości antygeny do stymulacji reakcji odpornościowej. Badania wykazały jednak, że i w tym przypadku zastosowanie promotorów indukowanych *in vivo* prowadzi do uzyskania lepszych rezultatów [32]. Pod kontrolą promotora genu *ssaG* sklonowano gen *eltB*, kodujący podjednostkę B toksyny LT enterotoksycznego szczepu *E. coli* (ETEC) [68]. Kasetę ekspresyjną wprowadzono do chromosomu szczepu *S. Typhi* M01ZH09. Wykazano, że ekspresja genu *eltB* w komórkach nośnika, które uległy fagocytozie przez ludzkie komórki U937 wzrasta aż 500-krotnie w porównaniu do poziomu jego ekspresji w komórkach *S. Typhi* hodowanych na sztucznej pożywce. Badanie poziomu odpowiedzi immunologicznej myszy immunizowanych donosowo pojedynczą dawką szczepionki wykazało indukcję specyficznych przeciwciał IgG jedynie w przypadku antygeny produkowanego *in vivo*. Jako kontrolę użyto szczepu produkującego antygen w sposób konstytutywny (gen *eltB* pod kontrolą promotora *tac*). Eksperyment ten dowodzi słuszności hipotezy mówiącej, że nie ilość produkowanego antygeny a odpowiedni czas jego produkcji i lokalizacja jest czynnikiem krytycznym w uzyskaniu odpowiedzi immunologicznej.

Indukcję ekspresji heterologicznego genu można także osiągnąć poprzez zastosowanie strategii opierającej się na kontrolowaniu liczby kopii cząsteczek plazmidu w komórce nośnika [52]. W tym celu stosuje się wektor ekspresyjny posiadający dwa różne systemy replikacji zapewniające różną liczbę jego kopii. W warunkach *in vitro* plazmid replikuje się dzięki konstytutywnemu systemowi replikacji warunkującemu jedną lub niewielką liczbę kopii w komórce. Sklonowanie genu kodującego białko inicjacyjne drugiego systemu replikacji pod kontrolą indukowalnego *in vivo* promotora umożliwia zwiększenie liczby kopii plazmidu, co skutkuje nadprodukcją heterologicznego białka w warunkach *in vivo* (Rys. 2). Dodatkowo sklonowanie heterologicznego genu na plazmidzie także pod kontrolą indukowalnego *in vivo* promotora może spotęgować zamierzony efekt.

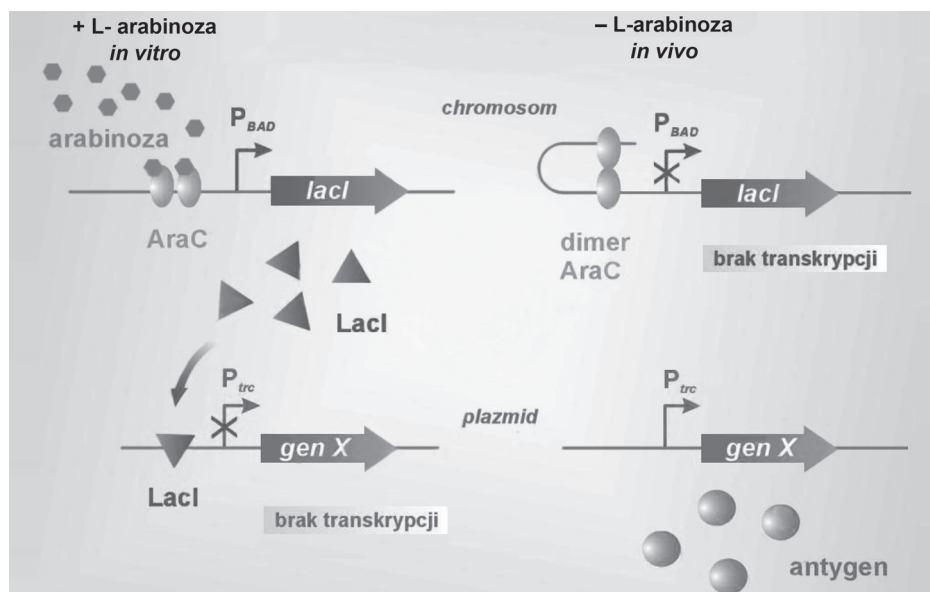
Podobną strategię zwaną także „*runaway-like replication*”, opartą na bardziej skomplikowanym mechanizmie regulacji kopijności plazmidu, zastosowano do nadprodukcji przez komórki *S. Typhimurium* w warunkach *in vivo* antygeny LcrV *Y. pestis* [74]. Immunizacja myszy skonstruowanym szczepem indukowała u zwierząt silną odpowiedź odpornościową zarówno typu Th1 jak i Th2, co chroniło je w eksperymencie protekcyjnym przed letalną dawką *Y. pestis*.

Inną metodą mającą na celu indukcję ekspresji heterologicznych genów w komórkach *Salmonella* w odpowiednim momencie infekcji jest zastosowanie promotorów ściśle regulowanych przez drobnocząsteczkowe substancje (Rys. 2) [52]. Jednym z promotorów, który umożliwia „zdalne sterowanie” ekspresją genów jest promotor arabinozowy. Wprowadzenie kasety zawierającej

gen kodujący białko regulatorowe oraz promotor (*araC* P_{BAD}) powyżej heterologicznego genu pozwala na kontrolowanie produkcji antygeny za pomocą induktora tj. arabinozy. W identyczny sposób można także sterować liczbą kopii cząsteczek plazmidu.

Alternatywną strategią do stosowania indukowalnych *in vivo* promotorów genów *Salmonella* jest zastosowaniem systemu RDAS (*regulated delayed antigen synthesis*) polegającego na opóźnionej produkcji antygeny [79]. W układzie tym heterologiczny gen zlokalizowany na plazmidzie klonowany jest pod kontrolą promotora *trc*. Promotor ten zapewnia wysoki poziom ekspresji i jest ściśle regulowany przez represor LacI. Gen kodujący białko regulatorowe zlokalizowany na chromosomie znajduje się poniżej kasety arabinozowej (*araC* P_{BAD}). W warunkach *in vitro* bakterie hodowane w obecności arabinozy produkują represor LacI, który hamuje ekspresję heterologicznego genu. Natomiast w warunkach *in vivo*, w uodparnianym organizmie, gdzie bakterie nie mają dostępu do arabinozy, ekspresja genu *lacI* zostaje zablokowana. Stężenie represora w komórkach zmniejsza się z każdym podziałem, co powoduje stopniową indukcję syntezy heterologicznego antygeny. Schemat działania systemu RDAS przedstawia Rys. 3. W celu poprawy kontroli produkcji antygeny w komórkach nośnika, natywny gen *lacI* poddano różnym modyfikacjom genetycznym m.in. zmieniono jego kodon inicjacyjny, sekwencję RBS oraz zoptymalizowano niektóre kodony biorąc pod uwagę ich używalność w komórkach rodzaju *Salmonella*. Zmiany te przyczyniły się do ściślej- szej represji heterologicznego genu w warunkach *in vitro* i wyższej indukcji jego ekspresji w warunkach *in vivo*. Badanie na modelu mysim przy użyciu antygeny PspA *S. pneumoniae* wykazały wyższą skuteczność szczepu *S. Typhimurium* produkującej antygen z opóźnieniem od szczepu produkującego go w sposób konstytutywny.

Ostatnio porównano także skuteczność działania systemu RDAS z układami stosującymi promotory indukowalne *in vivo* [81]. W tym celu skonstruowane zostały trzy plazmidy zawierające gen *pspA* *S. pneumoniae* pod kontrolą różnych promotorów: *trc*, *pagC* i *ssaG*. Wektory wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* produkujących i nieprodukujących represor LacI, a następnie immunizowano nimi myszy. Przeprowadzona analiza wykazała, że szczep *S. Typhimurium* z systemem RDAS indukuje u szczepionych zwierząt najwyższy poziom specyficznych przeciwciał klasy IgA i IgG rozpoznających antygen PspA. Uzyskana po immunizacji zwierząt odpowiedź humoralna była aż 100-krotnie wyższa od odpowiedzi immunologicznej uzyskanej w przypadku zastosowania do ekspresji genu *pspA* promotora *ssaG*. Poziom protekcji uodparnianych myszy po zakażeniu wirulentnym szczepem *S. pneumoniae* był porównywalny w przypadku użycia jako nośnika genu *pspA* *S. Typhimurium* RDAS i *S. Typhimurium* wyrażającej



Rys. 3. Schemat działania systemu opóźnionej produkcji antygeny (RDAS) w komórkach *Salmonella*.

W warunkach *in vitro* w podłożu uzupełnionym arabinozą gen *lacI*, sklonowany pod kontrolą promotora *BAD* ulega ekspresji a produkowany represor LacI blokuje transkrypcję genu *x* sklonowanego pod kontrolą promotora *trc*. W warunkach *in vivo* przy braku arabinozy dimer białka regulatorowego AraC uniemożliwia produkcję represora LacI co skutkuje ekspresją genu kodującego antygen.

PspA z promotora genu *pagC* w przeciwieństwie do użycia do ekspresji transgeny promotora genu *ssaG*. Zaobserwowane w tym eksperymencie różnice w produkcji heterologicznego antygeny z dwóch różnych indukowalnych *in vivo* promotorów mogą być spowodowane różnymi mechanizmami regulacyjnymi. Aktywność obu promotorów P_{pagC} i P_{ssaG} jest regulowana przez układ dwuskładnikowy PhoP-PhoQ, tak więc żaden z tych promotorów nie może być zastosowany do ekspresji heterologicznego genu w zczepie atenuowanym przez unieczynnienie genów kodujących białka tego układu dwuskładnikowego. Promotor P_{ssaG} jest dodatkowo regulowany przez mechanizmy warunkujące ekspresję genów wyspy patogenności SPI-2 jak np. układ dwuskładnikowy SsrA-SsrB, co może wpływać na skuteczność działania prototypu szczepionki. W tych eksperymentach wykazano, że system RDAS może być alternatywnym, do zastosowania promotorów indukowalnych *in vivo*, sposobem wzmocnienia immunogenności szczepionek opartych na żywych komórkach *Salmonella*. Jego zaletą jest zastosowanie mechanizmów regulatorowych „obcych” dla komórek rodzaju *Salmonella* i niezależnych od metodyki użytej do atenuacji szczepu nośnikowego.

5. Lokalizacja antygeny a typ odpowiedzi immunologicznej

Odpowiednia lokalizacja antygeny produkowanego w komórkach nośnikowych *Salmonella* jest istotna z kilku powodów. Heterologiczne białka w cytoplazmie, zwłaszcza ulegające nadprodukcji, mogą być toksyczne

dla komórek nośnikowych lub też mogą przyczynić się do obniżenia ich immunogenności. Białko o lokalizacji cytoplazmatycznej będzie dostępne dla komórek układu immunologicznego gospodarza dopiero po lizie komórek nośnika. Heterologiczne białka wybrane do konstrukcji szczepionek podjednostkowych to często białka zewnątrzkomórkowe, stąd ich lokalizacja w redukującym środowisku cytozolu może prowadzić do uzyskania nieprawidłowej konformacji. Ze względu na fakt, że wiele determinant antygenowych to epitopy konformacyjne, może się to przyczynić do braku indukcji specyficznych przeciwciał. Dodatkowo udokumentowano, że za pomocą różnych lokalizacji antygeny w komórkach *Salmonella* możliwe jest wzmocnienie i odpowiednie ukierunkowanie odpowiedzi immunologiczną gospodarza. Do tej pory opracowano bardzo wiele technologii mających na celu „wysyłanie” heterologicznych białek do peryplazmy, na powierzchnię komórek nośnika lub do otaczającego środowiska.

Kang i wsp. [40] wykorzystali do sekrecji antygeny PspA *S. pneumoniae* sekwencję sygnałną β -laktamazy (Bla) *E. coli*. Badania wykazały że fuzyjne białko Bla_{ss} -PspA wydzielane do peryplazmy i na zewnątrz komórek *S. Typhimurium* indukuje aż 10 000-krotnie wyższą specyficzną odpowiedź humoralną w porównaniu do białka produkowanego na terenie cytoplazmy [39]. Immunizacji myszy skonstruowanym szczepem *S. Typhimurium* o opóźnionej atenuacji, wydzielającym antygen PspA przy użyciu sekwencji sygnałnej Bla, efektywnie chroniła zwierzęta przed zakażeniem *S. pneumoniae* [51].

Do sekrecji heterologicznych białek do peryplazmy komórek *Salmonella* używano także sekwencji syg-

nalnych białek MalE i PhoA, a do ich prezentacji na powierzchni komórek nośnika fuzji translacyjnych z białkami OmpA, Lpp, LamB, a także fimbrii i auto-transporterów AIDA i MisL [7]. Produkowane w komórkach szczepu nośnikowego antygeny pobudzają głównie odpowiedź humoralną poprzez prezentację antygenów limfocytom CD4⁺ przez MHC klasy II.

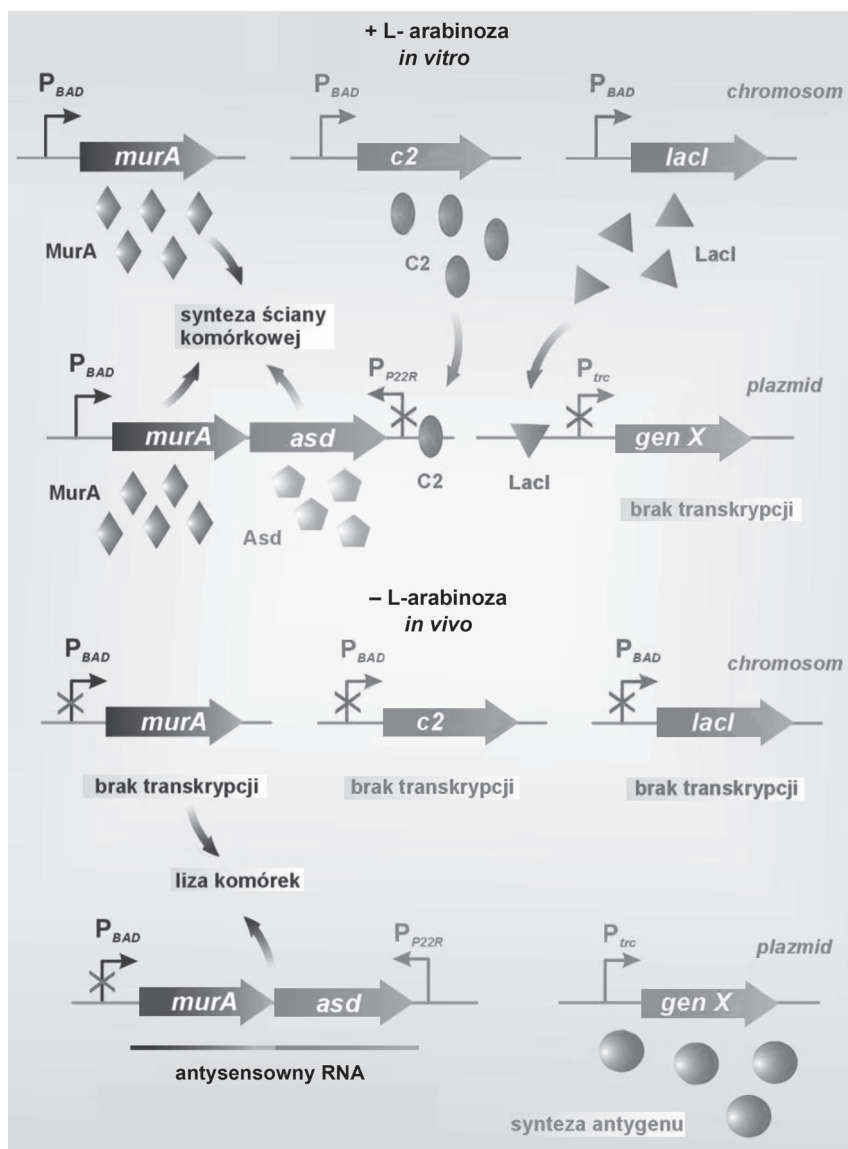
W konstrukcji szczepionek podjednostkowych wykorzystywane są także pęcherzyki zewnątrzkomórkowe OMV (*outer membrane vesicle*). OMV, będące naturalnymi proteoliposomami, produkowane są przez wiele gatunków mikroorganizmów, głównie gramujemnych, w różnych fazach wzrostu. Ich liczba wzrasta znacząco w warunkach stresowych. Zawierają głównie białka osłon komórkowych i białka peryplazmatyczne, w tym także czynniki wirulencji. Mechanizm segregacji białek do OMV nie został jak dotąd dokładnie wyjaśniony [16]. OMV mają zdolność do interakcji zarówno z komórkami prokariotycznymi jak i eukariotycznymi, są więc wykorzystywane do produkcji szczepionek podjednostkowych jako nośniki antygenów. Wchodzą m.in. w skład wieloskładnikowej podjednostkowej szczepionki anty-*Neisseria meningitidis* typu B (MenB) opracowanej przez firmę Novartis i będącej aktualnie w III fazie badań klinicznych [61].

Nietypową metodą mającą na celu sekrecję heterologicznych białek przez komórki *Salmonella* jest użycie fuzji z cytolizyną A (ClyA), nazywaną również SheA lub HlyE [23]. Nieznany jest mechanizm transportu tej toksyny przez błonę cytoplazmatyczną, udowodniono jednak, że w jej wydzielaniu poza komórkę bakteryjną biorą udział OMV [77]. Fuzje translacyjne heterologicznych antygenów z ClyA również wydajnie segregują do OMV, co umożliwia ich wydzielanie na zewnątrz komórki nośnika. Dodatkową zaletą tej specyficznej sekrecji antygenów może być pobudzenie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez LPS znajdujący się na powierzchni OMV [8, 43].

Strategię tą wykorzystano m.in. w konstrukcji szczepionki przeciwko wąglikowi. Badania wykazały, że immunizacja myszy szczepem *S. Typhimurium* produkującym fuzyjne białko ClyA-PA83 chroni zwierzęta przed zakażeniem sporami *B. anthracis* [67]. Podobnego efekty protekcyjnego nie uzyskano w przypadku zastosowania do sekrecji antygeny systemu sekrecji Hly (jednoetapowy system sekrecji typu I). Eksperyment przeprowadzony na małpach z wykorzystaniem szczepu szczepionkowego *S. Typhi* CVD 908-*htrA* jako nośnika potwierdził skuteczność immunizacji przy użyciu fuzyjnego białka ClyA-PA83 [19]. Efekt ten uzyskano niewątpliwie dzięki sekrecji antygeny na zewnątrz komórek *Salmonella*, którą potwierdzono za pomocą techniki mikroskopii elektronowej z użyciem przeciwciał znakowanych koloidalnym złotem (*immunogold staining*).

Interesującą niedawno opracowaną strategią mającą na celu uwolnienie z komórek nośnika produkowanego antygeny jest programowana liza komórek nośnika [45]. System ten jest dość skomplikowany i składa się z części kodowanej chromosomowo oraz wprowadzonej *in trans* na plazmidzie (Rys. 4). Szczep *S. Typhimurium* posiada w chromosomie m.in. gen *murA* pod kontrolą kasety arabinozowej (*araC P_{BAD}*) oraz delecję genu *asd*. Jak już wcześniej wspomniano produkty tych genów są niezbędne w syntezie peptydoglikanu. Na chromosomie pod kontrolą promotorów arabinozowych znajdują się także geny kodujące białka regulatorowe LacI (repressor promotora *trc*) i C2 (repressor promotora P22R). Na plazmidzie zaś znajdują się kopie genów *asd* oraz *murA* pod kontrolą promotora arabinozowego oraz pokrywającą się z nimi otwarta ramkę odczytu kodujący antysensowny RNA pod kontrolą promotora P22R. Plazmid zawiera także gen kodujący heterologiczny antygen pod kontrolą promotora *trc*. W warunkach *in vitro* w obecności arabinozy ekspresji ulegają geny *asd*, *murA*, *c2* i *lacI*, co zapewnia normalny wzrost komórek oraz blokuje ekspresję heterologicznego genu. W środowisku pozbawionym arabinozy, ekspresja wyżej wymienionych genów ulega zahamowaniu. Odblokowana zostaje zaś ekspresja genów kodujących antygen oraz antysensowny RNA *asd-murA*. Blokuje to całkowicie produkcję białek Asd i MurA w komórce, co w konsekwencji prowadzi do jej lizy i uwolnienia antygeny. Metodę to wykorzystano m.in. w konstrukcji prototypów szczepionek przeciwko *S. pneumoniae* [45], *M. tuberculosis* [38] czy wirusowi grypy [2].

Dla wzmocnienia odpowiedzi komórkowej skonstruowano szczep *Salmonella* wydzielające heterologiczne antygeny na zewnątrz komórki, do cytozolu komórek eukariotycznych. W tym celu wykorzystano systemy transportu typu III *S. enterica* kodowane przez geny zlokalizowane na SPI-1 i SPI-2. Te systemy sekrecji aktywne są na różnych etapach infekcji. SPI-1 warunkuje inwazję do komórek eukariotycznych, SPI-2 jest aktywny podczas wzrostu *Salmonella* wewnątrz komórek eukariotycznych i warunkuje biogenezę wakuoli (SCV – *Salmonella containing vacuole*). Oba przekazują do komórek eukariotycznych wiele białek efektorowych modulujących ich metabolizm [1, 60, 82]. Stworzenie fuzji translacyjnych heterologicznych antygenów z N-fragmentami białek efektorowych SPI-1 tj. SopE czy SptP przyczyniało się do zwiększenia prezentacji antygeny cytotoksycznym limfocytów T CD8⁺ z udziałem cząsteczek MHC klasy I. Skuteczność działania tego typu fuzji efektorów SPI-1 udokumentowano w stosunku do kilku antygenów *Eimeria* (czynnik etiologiczny kokcydiozy drobiu) [46,47] oraz w immunizacji myszy antygenami (ESAT- 6 i CFP-10) *M. tuberculosis* [37]. Nie we wszystkich eksperymentach uzyskano efekty pozytywne. Immunizacja ochotników atenuowanym szczepem



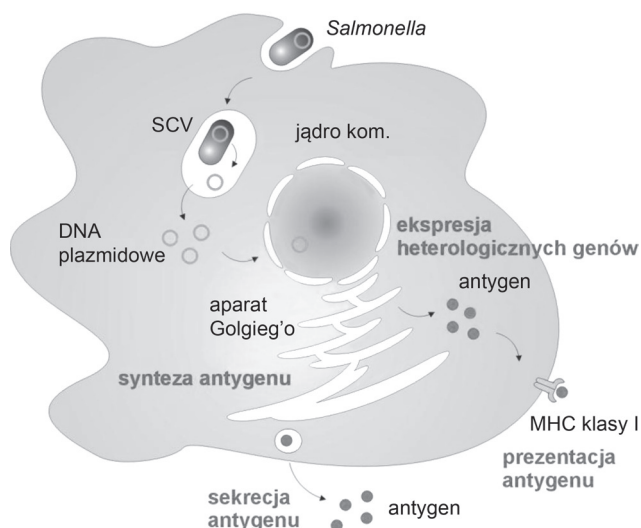
Rys. 4. Schemat „programowanej lizy” komórek *Salmonella* w warunkach *in vivo*.

W warunkach *in vitro* w podłożu uzupełnionym arabinozą ekspresji ulegają geny sklonowane pod kontrolą promotora *BAD* tj. *murA* i *asd*, kodujące enzymy niezbędne do syntezy ściany komórkowej oraz *c2* i *lacI*, kodujące represory blokujące syntezę antysensownego mRNA *murA-asd* oraz heterologicznego antygeny. W warunkach *in vivo* przy braku arabinozy zablockowana zostaje ekspresja genów *murA*, *asd*, których produkty są niezbędne do przeżycia komórek. Jednocześnie w komórce zahamowaniu ulega produkcja represorów *C2* i *LacI*, co umożliwia ekspresję sklonowanego pod kontrolą promotora *P22R* antysensowny RNA *murA-asd* oraz sklonowanego pod kontrolą promotora *trc* genu kodujący antygen. W konsekwencji prowadzi to do lizy komórek i uwolnienia dużej ilości antygeny.

Salmonella niosącym fuzje białka Gag wirusa HIV i SopE *Salmonella* nie skutkowało indukcją odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko antygenowi Gag [49]. Różnice w efektach eksperymentów mogą wynikać zarówno z użytego modelu doświadczalnego (immunizacja kurcząt, myszy lub ludzi) jak i innych szczepów nośnikowych. Skuteczność działania fuzji translacyjnych domen translokacyjnych pięciu białek efektorowych SPI-2 (SiFA, SteC, SseL, SceJ i SseF) z modelowymi antygenami (owoalbumina i listeriolizyna) wykazała, że choć *in vitro* wszystkie fuzje ulegały translokacji do cytozolu komórek gospodarza to w eksperymentach *in vivo* na modelu mysim tylko dwie indukowały znaczący poziom odpowiedzi komórkowej

[29, 36]. Prezentowane dane wskazują, jak wnikliwie musi być doborzony system transportu heterologicznych antygenów. Poznanie mechanizmów indukcji odpowiedzi immunologicznej związanej z prezentacją antygenów za pomocą MHC klasy I przez komórki *Salmonella* będące nośnikami antygenów zapoczątkowało badania nad ich wykorzystaniem jako szczepionek antynowotworowych [57].

Ciekawym rozwiązaniem pozwalającym na prezentację antygenów za pomocą MHC klasy I oraz jednocześnie uniknięcie niedogodnień związanych z nadprodukcją heterologicznych antygenów na terenie komórki nośnikowej tj. zaburzeń metabolizmu, toksyczności czy zmniejszenia immunogenności, jest zastosowanie



Rys. 5. Schemat działania szczepionki DNA skonstruowanej z użyciem komórek *Salmonella* jako nośnika. Opis w tekście.

układu pozwalającego na ekspresję antygenów na terenie komórek eukariotycznych. Do tej pory komórki *Salmonella* zostały z powodzeniem wykorzystane jako nośnik szczepionek DNA przeciwko wielu patogenom zarówno wirusowym tj. HIV [41], wirusy odry [59], opryszczki [17] czy zapalenia wątroby typu B i C [6,83] jak i bakteryjnym tj. *Chlamydia trachomatis* [5], *Clostridium tetani* [58], *L. monocytogenes* [14] czy *M. tuberculosis* [33].

W przypadku konstrukcji tego typu szczepionek heterologiczny gen musi znajdować się na plazmidzie pod kontrolą promotora funkcjonalnego w komórkach eukariotycznych – najczęściej promotora CMV (wirusa cytomegalii) lub SV40 (*simian virus 40*), a rolą *Salmonella* jest jedynie dostarczenie DNA plazmidowego do komórek prezentujących antygen (APC). Po liście bakterii w fagosomie cząsteczki wektora zawierający heterologiczny gen są transportowane do jądra komórkowego (Rys. 5). Mechanizm tego procesu pozostaje nadal nieznan, co niewątpliwie utrudnia prace nad optymalizacją szczepionek DNA. Na terenie jądra komórkowego heterologiczny gen ulega ekspresji. Syntetyzowany antygen traktowany jest jako endogenne białko i prezentowany przez komórki prezentujące antygen z udziałem cząsteczek MHC klasy I, co stymuluje odpowiedź komórkową związaną z limfocytami T CD8⁺. Wykazano jednak, że szczepionki DNA stymulują także odpowiedź humoralną i komórkową związaną z limfocytami Th, co wynika ze zjawiska krzyżowej prezentacji antygenów (*cross-presentation*) [65].

6. Podsumowanie

Opisane powyżej strategie używane w konstrukcji szczepionek podjednostkowych opartych na awirulentnych szczepach *Salmonella* pozwalają na zróżnicowaną

modulację odpowiedzi odpornościowej immunizowanego gospodarza. Jednakże należy podkreślić, iż wybór odpowiedniej strategii nie jest prosty, a efekt immunizacji jest często trudny do przewidzenia. W konstrukcji tego typu szczepionek musi być brane pod uwagę wiele elementów: od wyboru odpowiedniego zestawu antygenów protekcyjnych, przez genotyp i właściwości atenuowanego szczepu nośnikowego, rodzaj stosowanych promotorów do wyrażania heterologicznych genów, strategię prezentacji antygeny komórkom prezentującym antygen, po dobranie odpowiedniego modelu zwierzęcego.

Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu MNiSW N N302 236838, decyzja 2368/B/P01/2010/38.

Piśmiennictwo

1. Agbor T.A., McCormick B.A.: *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cell Microbiol.* **13**, 1858–1869 (2011)
2. Ameiss K., Ashraf S., Kong W., Pekosz A., Wu W.H., Milich D., Billaud J.N., Curtiss R., 3rd: Delivery of woodchuck hepatitis virus-like particle presented influenza M2e by recombinant attenuated *Salmonella* displaying a delayed lysis phenotype. *Vaccine*, **28**, 6704–6713 (2010)
3. Attridge S.R., Davies R., LaBrooy J.T.: Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. *Vaccine*, **15**, 155–162 (1997)
4. Branger C.G., Sun W., Torres-Escobar A., Perry R., Roland K.L., Fetherston J., Curtiss R., 3rd: Evaluation of Psn, HmuR and a modified LcrV protein delivered to mice by live attenuated *Salmonella* as a vaccine against bubonic and pneumonic *Yersinia pestis* challenge. *Vaccine*, **29**, 274–282 (2011)
5. Brunham R.C., Zhang D.: Transgene as vaccine for chlamydia. *Am. Heart J.* **138**, S519–522 (1999)
6. Cao J., Chen Z., Ren Y., Luo Y., Cao M., Lu W., Zhao P., Qi Z.: Oral immunization with attenuated *Salmonella* carrying a co-expression plasmid encoding the core and E2 proteins of hepatitis C virus capable of inducing cellular immune responses and neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, **29**, 3714–3723 (2011)
7. Cheminay C., Hensel M.: Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 87–98 (2008)
8. Chen D.J., Osterrieder N., Metzger S.M., Buckles E., Doody A.M., DeLisa M.P., Putnam D.: Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3099–3104 (2010)
9. Chen H., Schifferli D.M.: Enhanced immune responses to viral epitopes by combining macrophage-inducible expression with multimeric display on a *Salmonella* vector. *Vaccine*, **19**, 3009–3018 (2001)
10. Covone M.G., Brocchi M., Palla E., Dias da Silveira W., Rappuoli R., Galeotti C.L.: Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **66**, 224–231 (1998)
11. Curtiss R., 3rd, Galan J.E., Nakayama K., Kelly S.M.: Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. *Res. Microbiol.* **141**, 797–805 (1990)

12. Curtiss R., 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., Mo H., Wang S., Kong W.: *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. *Infect. Immun.* **77**, 1071–1082 (2009)
13. Curtiss R., 3rd, Lee I.S.: *ispA*: Induction of host immune responses using *Salmonella*-vectored vaccines (w) Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, red. Brogden K.A., Minion F.C., Cornick N., ASM Press, Washington, D.C., 2007, s. 297–313
14. Darji A., zur Lage S., Garbe A.I., Chakraborty T., Weiss S.: Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 341–349 (2000)
15. DiPetrillo M.D., Tibbetts T., Kleanthous H., Killeen K.P., Hohmann E.L.: Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine*, **18**, 449–459 (1999)
16. Ellis T.N., Kuehn M.J.: Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 81–94 (2010)
17. Flo J., Tisminetzky S., Baralle F.: Oral transgene vaccination mediated by attenuated *Salmonellae* is an effective method to prevent Herpes simplex virus-2 induced disease in mice. *Vaccine*, **19**, 1772–1782 (2001)
18. Fraillery D., Baud D., Pang S.Y., Schiller J., Bobst M., Zosso N., Ponci F., Nardelli-Haeffliger D.: *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1285–1295 (2007)
19. Galen J.E., Chinchilla M., Pasetti M.F., Wang J.Y., Zhao L., Arciniega-Martinez I., Silverman D.J., Levine M.M.: Mucosal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing protective antigen of anthrax toxin (PA83) primes monkeys for accelerated serum antibody responses to parenteral PA83 vaccine. *J. Infect. Dis.* **199**, 326–335 (2009)
20. Galen J.E., Nair J., Wang J.Y., Wasserman S.S., Tanner M.K., Szein M.B., Levine M.M.: Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **67**, 6424–6433 (1999)
21. Galen J.E., Pasetti M.F., Tennant S., Ruiz-Olvera P., Szein M.B., Levine M.M.: *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 400–412 (2009)
22. Galen J.E., Wang J.Y., Chinchilla M., Vindurampulle C., Vogel J.E., Levy H., Blackwelder W.C., Pasetti M.F., Levine M.M.: A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect. Immun.* **78**, 337–347 (2010)
23. Galen J.E., Zhao L., Chinchilla M., Wang J.Y., Pasetti M.F., Green J., Levine M.M.: Adaptation of the endogenous *Salmonella enterica* serovar Typhi *clxA*-encoded hemolysin for antigen export enhances the immunogenicity of anthrax protective antigen domain 4 expressed by the attenuated live-vector vaccine strain CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **72**, 7096–7106 (2004)
24. Garmory H.S., Brown K.A., Titball R.W.: *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 339–353 (2002)
25. Garmory H.S., Leckenby M.W., Griffin K.F., Elvin S.J., Taylor R.R., Hartley M.G., Hanak J.A., Williamson E.D., Cranenburgh R.M.: Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Infect. Immun.* **73**, 2005–2011 (2005)
26. Gerdes K., Wagner E.G.: RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 117–124 (2007)
27. Germanier R., Furer E.: Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**, 553–558 (1975)
28. Germanier R., Furer E.: Characteristics of the attenuated oral vaccine strain “*S. typhi*” Ty 21a. *Dev. Biol. Stand.* **53**, 3–7 (1983)
29. Hegazy W.A., Xu X., Metelitsa L., Hensel M.: Evaluation of *Salmonella enterica* type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. *Infect. Immun.* **80**, 1193–1202 (2012)
30. Hessel L., Debois H., Fletcher M., Dumas R.: Experience with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 609–620 (1999)
31. Hohmann E.L., Oletta C.A., Killeen K.P., Miller S.I.: *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J. Infect. Dis.* **173**, 1408–1414 (1996)
32. Hohmann E.L., Oletta C.A., Loomis W.P., Miller S.I.: Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2904–2908 (1995)
33. Huang J.M., Sali M., Leckenby M.W., Radford D.S., Huynh H.A., Delogu G., Cranenburgh R.M., Cutting S.M.: Oral delivery of a DNA vaccine against tuberculosis using operator-repressor titration in a *Salmonella enterica* vector. *Vaccine*, **28**, 7523–7528 (2010)
34. Hussein M.I., Hensel M.: Evaluation of *Salmonella* live vaccines with chromosomal expression cassettes for translocated fusion proteins. *Vaccine*, **27**, 3780–3787 (2009)
35. Hussein M.I., Hensel M.: Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect. Immun.* **73**, 1598–1605 (2005)
36. Hussein M.I., Wartha F., Hensel M.: Recombinant vaccines based on translocated effector proteins of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Vaccine*, **25**, 185–193 (2007)
37. Juarez-Rodriguez M.D., Arteaga-Cortes L.T., Kader R., Curtiss R., 3rd, Clark-Curtiss J.E.: Live attenuated *Salmonella* vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* with antigen delivery via the type III secretion system. *Infect. Immun.* **80**, 798–814 (2012)
38. Juarez-Rodriguez M.D., Yang J., Kader R., Alamuri P., Curtiss R., 3rd, Clark-Curtiss J.E.: Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **80**, 815–831 (2012)
39. Kang H.Y., Curtiss R., 3rd: Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**, 99–104 (2003)
40. Kang H.Y., Srinivasan J., Curtiss R., 3rd: Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect. Immun.* **70**, 1739–1749 (2002)
41. Karpenko L.I., Danilenko A.V., Bazhan S.I., Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Kaplina O.N., Volkova O.Y., Oreshkova S.F., Ilyichev A.A.: Attenuated *Salmonella enteritidis* E23 as a vehicle for the rectal delivery of DNA vaccine coding for HIV-1 polyepitope CTL immunogen. *Microb. Biotechnol.* **5**, 241–250 (2012)
42. Keitel W.A., Bond N.L., Zahradnik J.M., Cramton T.A., Robbins J.B.: Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. *Vaccine*, **12**, 195–199 (1994)
43. Kim J.Y., Doody A.M., Chen D.J., Cremona G.H., Shuler M.L., Putnam D., DeLisa M.P.: Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J. Mol. Biol.* **380**, 51–66 (2008)

44. Kirkpatrick B.D., Taylor D.N. i wsp.: Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhi (Ty2 *aroC-ssaV-*) M01ZH09, with a defined mutation in the *Salmonella* pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers. *Vaccine*, **24**, 116–123 (2006)
45. Kong W., Wanda S.Y., Zhang X., Bollen W., Tinge S.A., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9361–9366 (2008)
46. Konjufca V., Jenkins M., Wang S., Juarez-Rodriguez M.D., Curtiss R., 3rd: Immunogenicity of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains carrying a gene that encodes *Eimeria tenella* antigen SO7. *Infect. Immun.* **76**, 5745–5753 (2008)
47. Konjufca V., Wanda S.Y., Jenkins M.C., Curtiss R., 3rd: A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge. *Infect. Immun.* **74**, 6785–6796 (2006)
48. Kopecko D.J., Dietrich G. i wsp.: Genetic stability of vaccine strain *Salmonella* Typhi Ty21a over 25 years. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 233–246 (2009)
49. Kotton C.N., Hohmann E.L. i wsp.: Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. *Vaccine*, **24**, 6216–6224 (2006)
50. Levine M.M., Ferreccio C., Abrego P., Martin O.S., Ortiz E., Cryz S.: Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine*, **17**, Suppl. 2, S22–27 (1999)
51. Li Y., Wang S., Scarpellini G., Gunn B., Xin W., Wanda S.Y., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 593–598 (2009)
52. Loessner H., Endmann A., Leschner S., Bauer H., Zelmer A., zur Lage S., Westphal K., Weiss S.: Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 21–26 (2008)
53. Mastroeni P., Grant A.J.: Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Rev. Mol. Med.* **13**, e12 (2011)
54. Micoli F., Martin L.B. i wsp.: Vi-CRM 197 as a new conjugate vaccine against *Salmonella* Typhi. *Vaccine*, **29**, 712–720 (2011)
55. Miller V.L., Beer K.B., Loomis W.P., Olson J.A., Miller S.I.: An unusual *pagC::TnphoA* mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infect. Immun.* **60**, 3763–3770 (1992)
56. Orr N., Galen J.E., Levine M.M.: Novel use of anaerobically induced promoter, *dmsA*, for controlled expression of fragment C of tetanus toxin in live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 908-*htrA*. *Vaccine*, **19**, 1694–1700 (2001)
57. Panthel K., Meinel K.M., Sevil Domenech V.E., Trulzsch K., Russmann H.: *Salmonella* type III-mediated heterologous antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 99–103 (2008)
58. Pasetti M.F., Anderson R.J., Noriega F.R., Levine M.M., Sztein M.B.: Attenuated *deltaguaBA Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin. Immunol.* **92**, 76–89 (1999)
59. Pasetti M.F., Levine M.M. i wsp.: Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats. *J. Virol.* **77**, 5209–5217 (2003)
60. Patel J.C., Galan J.E.: Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* – all in the name of entry. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 10–15 (2005)
61. Rinaudo C.D., Telford J.L., Rappuoli R., Seib K.L.: Vaccinology in the genome era. *J. Clin. Invest.* **119**, 2515–2525 (2009)
62. Roberts M., Li J., Bacon A., Chatfield S.: Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from the *nirB* and *htrA* promoters. *Infect. Immun.* **66**, 3080–3087 (1998)
63. Rondini S., Micoli F., Lanzilao L., Hale C., Saul A.J., Martin L.B.: Evaluation of the immunogenicity and biological activity of the *Citrobacter freundii* Vi-CRM197 conjugate as a vaccine for *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 460–468 (2011)
64. Salam M.A., Katz J., Zhang P., Hajishengallis G., Michalek S.M.: Immunogenicity of *Salmonella* vector vaccines expressing SBR of *Streptococcus mutans* under the control of a T7-*nirB* (dual) promoter system. *Vaccine*, **24**, 5003–5015 (2006)
65. Schoen C., Stritzker J., Goebel W., Pilgrim S.: Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 319–335 (2004)
66. Shi H., Santander J., Brenneman K.E., Wanda S.Y., Wang S., Senechal P., Sun W., Roland K.L., Curtiss R.: Live recombinant *Salmonella* Typhi vaccines constructed to investigate the role of *rpoS* in eliciting immunity to a heterologous antigen. *PLoS One*, **5**, e11142 (2010)
67. Stokes M.G., Atkins H.S. i wsp.: Oral administration of a *Salmonella enterica*-based vaccine expressing *Bacillus anthracis* protective antigen confers protection against aerosolized *B. anthracis*. *Infect. Immun.* **75**, 1827–1834 (2007)
68. Stratford R., Khan S.A. i wsp.: Optimization of *Salmonella enterica* serovar typhi Delta α roC DeltassaV derivatives as vehicles for delivering heterologous antigens by chromosomal integration and *in vivo* inducible promoters. *Infect. Immun.* **73**, 362–368 (2005)
69. Tacket C.O., Levine M.M. i wsp.: Safety and immune responses to attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Clin. Immunol.* **97**, 146–153 (2000)
70. Tacket C.O., Levine M.M.: CVD 908, CVD 908-*htrA*, and CVD 909 live oral typhoid vaccines: a logical progression. *Clin. Infect. Dis.* **45**, Suppl. 1, S20–23 (2007)
71. Thiem V.D., Szu S.C. i wsp.: The Vi conjugate typhoid vaccine is safe, elicits protective levels of IgG anti-Vi, and is compatible with routine infant vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 730–735 (2011)
72. Torres-Escobar A., Juarez-Rodriguez M.D., Branger C.G., Curtiss R., 3rd: Evaluation of the humoral immune response in mice orally vaccinated with live recombinant attenuated *Salmonella enterica* delivering a secreted form of *Yersinia pestis* PsaA. *Vaccine*, **28**, 5810–5816 (2010)
73. Torres-Escobar A., Juarez-Rodriguez M.D., Curtiss R., 3rd: Biogenesis of *Yersinia pestis* PsaA in recombinant attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine (RASV) strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 106–113 (2010)
74. Torres-Escobar A., Juarez-Rodriguez M.D., Gunn B.M., Branger C.G., Tinge S.A., Curtiss R., 3rd: Fine-tuning synthesis of *Yersinia pestis* LcrV from runaway-like replication balanced-lethal plasmid in a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine induces protection against a lethal *Y. pestis* challenge in mice. *Infect. Immun.* **78**, 2529–2543 (2010)
75. Tran T.H., Dolecek C. i wsp.: A randomised trial evaluating the safety and immunogenicity of the novel single oral dose typhoid

- vaccine M01ZH09 in healthy Vietnamese children. *PLoS One*, **5**, e11778 (2010)
76. van Damme P., Podda A. i wsp.: Safety, immunogenicity and dose ranging of a new Vi-CRM conjugate vaccine against typhoid fever: randomized clinical testing in healthy adults. *PLoS One*, **6**, e25398 (2011)
77. Wai S.N., Uhlin B.E. i wsp.: Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, **115**, 25–35 (2003)
78. Wanda S.Y., Konjufca V., Curtiss R., 3rd: Stability of protective antigen expression *in vivo* is essential for recombinant vaccine efficacy. ASM 107th General Meeting, Toronto, Kanada, 2007
79. Wang S., Curtiss R., 3rd i wsp.: *Salmonella* vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis *in vivo* to enhance immunogenicity. *Infect. Immun.* **78**, 3969–3980 (2010)
80. Wang S., Li Y., Shi H., Scarpellini G., Torres-Escobar A., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Immune responses to recombinant pneumococcal PsaA antigen delivered by a live attenuated *Salmonella* vaccine. *Infect Immun* **78**, 3258–3271 (2010)
81. Wang S., Li Y., Shi H., Sun W., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Comparison of a regulated delayed antigen synthesis system with *in vivo*-inducible promoters for antigen delivery by live attenuated *Salmonella* vaccines. *Infect. Immun.* **79**, 937–949 (2011)
82. Waterman S.R., Holden D.W.: Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* **5**, 501–511 (2003)
83. Woo P.C., Wong L.P., Zheng B.J., Yuen K.Y.: Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, **19**, 2945–2954 (2001)
84. Wyszynska A., Raczko A., Lis M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, **22**, 1379–1389 (2004)

Tomasz Jagielski^{1*}, Elżbieta Rup^{2†}, Anna B. Macura², Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
²Zakład Mykologii, Katedra Mikrobiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

Spis treści: 1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia i klasyfikacja grzybów z rodzaju *Malassezia*. 3. Mikrobiologia grzybów z rodzaju *Malassezia*. 3.1. Charakterystyka ogólna. 3.2. Metabolizm. 3.3. Aktywność enzymatyczna. 4. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z innymi mikroorganizmami. 5. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z układem immunologicznym. 5.1. Serologia i budowa antygenowa. 5.2. Interakcje z układem dopełniacza. 5.3. Wpływ grzybów *Malassezia* sp. na różne populacje komórek w skórze. 6. Podsumowanie

Characterization of fungi of the *Malassezia* genus. I. Microbiological and immunological aspects

Abstract: The yeasts of the *Malassezia* genus, first described over a century ago, belong to the physiological microflora of the human skin. However, they may occasionally act as opportunistic pathogens resulting in different dermatological pathologies, of which pityriasis versicolor is most frequently diagnosed. Two principle features of the genus *Malassezia* are distinctive morphology and requirement for external lipid source for growth. To date, the genus accommodates 14 species, all but one being lipid-dependent species. The very recently completed sequencing of the *M. globosa* genome disclosed the presence of multiple secreted lipases to help the yeasts to utilize cutaneous lipids. Very little is known about interactions between *Malassezia* organisms and the human host. It is clear however that *Malassezia* fungi display two phenotypes within the skin, one – immunostimulatory, and the other immunosuppressive, which are responsible for commensal and pathogenic behavior of the fungi, respectively.

This article provides a concise and up-to-date description of the *Malassezia* genus, with particular attention to the microbiology of the fungi and their interactions with the immune system of the human host.

Content: 1. Introduction. 2. Taxonomy and classification of *Malassezia* fungi. 3. Microbiology of *Malassezia* fungi. 3.1. General characteristics. 3.2. Metabolism. 3.3. Enzymatic activity. 4. Interactions of *Malassezia* fungi with other microorganisms. 5. Interactions of *Malassezia* fungi with the immune system. 5.1. Serology and antigenic structure. 5.2. Interactions with the complement system. 5.3. Influence of *Malassezia* fungi on different cell populations within the skin. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: atopowe zapalenie skóry (AZS), grzybnice, łuszczyca, *Malassezia* sp., zakażenia skóry

Key words: atopic dermatitis (AD), *Malassezia* sp., mycoses, psoriasis, skin infections

1. Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Malassezia* należą do patogenów oportunistycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla ludzi i niektórych zwierząt. Mogą być izolowane ze zdrowej skóry oraz powodować pewne choroby dermatologiczne, a w przypadku znacznego obniżenia odporności, mogą także przyczynić się do wystąpienia zakażeń ogólnoustrojowych. Do najczęściej występujących dermatoz związanych z infekcją grzybami z rodzaju *Malassezia* u ludzi należą łupież pstry (*pityriasis versicolor*) oraz zapalenie mieszków włosowych (*Malassezia folliculitis*). Grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą również nasilać zmiany chorobowe w schorzeniach, takich jak łojotokowe zapalenie skóry (*dermatitis seborrhoica*) oraz zaostrzać przebieg łuszczycy (*psoriasis*) i atopowego zapalenia skóry (*dermatitis atopica*) [3, 9, 17, 28, 37, 38]. Częstość powierzchniowych zakażeń grzybiczych wywołanych przez grzyby z rodzaju *Malassezia* zależy

od wielu różnorodnych czynników, w tym od warunków socjoekonomicznych, klimatycznych czy geograficznych. Dzięki badaniom z zakresu biologii molekularnej zidentyfikowano obecnie 14 gatunków *Malassezia*, w tym 13 lipidozależnych (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. dermatitis*, *M. restricta*, *M. equina*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. caprae* i *M. cuniculi*) oraz jeden gatunek lipidoniezależny (*M. pachydermatis*) [17, 38, 39, 60, 61].

Łuszczyca (*psoriasis*) jest jedną z najczęściej występujących przewlekłych zapalnych chorób skóry. Szacuje się, że około 1–5% populacji europejskiej choruje na łuszczycę. Patogeneza łuszczycy nie jest do końca poznana. Istnieje wiele czynników predysponujących do wystąpienia choroby, wśród których ważne miejsce zajmują czynniki genetyczne. Zakażenia zarówno systemowe jak i miejscowe wywołane przez paciorkowce beta-hemolizujące, czy grzyby z rodzaju *Candida* stanowią znany czynnik inicjujący epizod łuszczycy wysiewnej czy

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: +48 (0) 22 55-41-312; fax: +48 (0) 22 55-41-402; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl.

† Autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy.

zaostrażający przebieg łuszczycy plackowatej. W wielu badaniach wykazano, że stymulacja leukocytów jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z łuszczycą przez superantygeny paciorkowców grupy A wiązała się ze znacznie zwiększoną odpowiedzią proliferacyjną oraz uwalnianiem cytokin prozapalnych przez leukocyty [6, 13, 41]. Wiele badań klinicznych i przedklinicznych potwierdza udział grzybów z rodzaju *Malassezia* w rozwoju zmian łuszczycowych, zwłaszcza w przypadku łuszczycy owłosionej skóry głowy oraz okolicy narządów płciowych [49, 63]. Obecnie uważa się, że grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą nasilać przebieg łuszczycy poprzez uwalnianie cytokin prozapalnych, aktywację czynników przyspieszających proliferację keratynocytów oraz wydzielanie enzymów hydrolitycznych [3].

Atopowe zapalenie skóry (*atopic dermatitis*, AD, AZS) jest przewlekłą, nawrotową dermatozą świądową dotyczącą głównie wieku dziecięcego. AZS może przebiegać jako izolowane schorzenie lub stanowić manifestację ogólnoustrojowych zaburzeń o podłożu alergicznym wraz z katarą sienną, astmą oskrzelową czy alergiami pokarmowymi. Wśród osób dorosłych AZS obserwuje się u 1–3% populacji. Choroba może pojawić się po raz pierwszy w wieku dorosłym, utrzymywać się od okresu dziecięcego lub nawrócić po wieloletniej remisji [42, 64]. Grzyby z rodzaju *Malassezia* wydają się stanowić istotny czynnik w patogenezie AZS u osób dorosłych, zwłaszcza ze zmianami skórnymi zlokalizowanymi na głowie i szyi [24]. Częstość występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze dorosłych pacjentów z AZS oraz w populacji zdrowej jest podobna i wynosi między 50% a 80%, w zależności od zastosowanej metody badawczej. Natomiast w przypadku pacjentów z AZS znacząco częściej obserwuje się dodatnie testy skórne z alergenami *Malassezia* sp. oraz wysokie miana swoistych przeciwciał w klasie IgE przeciwko *Malassezia* sp. w surowicy chorych w porównaniu do grup kontrolnych [5, 45, 56]. Stąd, obecnie uważa się, że grzyby *Malassezia* sp. stanowią raczej czynnik alergizujący niż infekcyjny w przypadku pacjentów z AZS. Nasilenie zmian skórnych u pacjentów z AZS

może nastąpić również na drodze aktywacji procesów zapalnych poprzez uwalnianie przez grzyby *Malassezia* sp. enzymy hydrolityczne [1, 58].

Dokładne poznanie mechanizmów immunomodulacyjnych u grzybów z rodzaju *Malassezia* wymaga dalszych badań. Dostępne obecnie dane sugerują, że u osób ze zdrową skórą (z prawidłową barierą skórno-naskórkową) grzyby *Malassezia* sp. wywierają efekt immunosupresyjny, co pozwala im przetrwać w roli komensala, natomiast w przypadku pacjentów z łuszczycą lub atopowym zapaleniem skóry grzyby stymulują odpowiedź zapalną, która nasila przebieg choroby podstawowej i przyczynia się do podtrzymywania zmian skórnych [3].

2. Taksonomia i klasyfikacja grzybów z rodzaju *Malassezia*

Grzyby z rodzaju *Malassezia* są uznawane za składnik mikroflory skóry u ludzi i niektórych zwierząt od ponad 150 lat. *Malassezia* sp. należą do grzybów dimorficznych, występujących zarówno w fazie mycelialnej, jak i drożdżowej. Przez wiele lat obie formy morfologiczne uznawano za odrębne gatunki. Związek pomiędzy występowaniem *Malassezia* sp. a zmianami skórnymi po raz pierwszy zaobserwował E i c h s t e d t w 1846 roku. Uczony ten w łuskach pobranych ze skóry chorobowo zmienionej pacjenta z łupieżem pstrym zaobserwował strzępki grzybni. Następnie, w 1874 roku M a l a s s e z zaobserwował i opisał obecność komórek o kształcie owalnym i okrągłym w zeszkrobinach naskórka od pacjentów z łupieżem. Nazwę *Malassezia* zaproponował w 1889 roku B a i l l o n na cześć wspomnianego wcześniej badacza. W warunkach *in vitro* grzyby z rodzaju *Malassezia* wyhodowali po raz pierwszy C a s t e l l a n i i C h a l m e r s w 1913 roku. Badacze ci scharakteryzowali ich właściwości wzrostowe oraz wprowadzili nazwę *Pityrosporium ovale*. W 1925 roku W e i d m a n n wyodrębnił w hodowli gatunek – *Malassezia pachydermatis*. (Gatunek ten nie należy do fizjologicznej flory skóry człowieka; izolowany jest natomiast ze skóry

Tabela I

Pozycja taksonomiczna grzybów z rodzaju *Malassezia*

Królestwo:	Fungi			
Typ:	Basidiomycota			
Klasa:	Ustilagomycetes			
Podklasa:	Exobasidiomycetidae			
Rząd:	Malasseziales			
Rodzaj:	<i>Malassezia</i>			
Gatunki:	<i>M. furfur</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. nana</i>
	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. japonica</i>	<i>M. yamatoensis</i>
	<i>M. sloofiae</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. dermatis</i>	<i>M. equine</i>
	<i>M. caprae</i>			

ptaków i ssaków, w tym często – zwierząt domowych). W 1951 roku G o r d o n wyizolował ze zmian skórnych u chorych z łupieżem pstym, a także ze zdrowej ludzkiej skóry – komórki przypominające drożdże – kuliste lub owalne, otoczone podwójną otoczką i nadał im nazwę *Pityrosporium orbiculare* [33, 69]. Dopiero w 1977 roku udało się w warunkach *in vitro* wykazać konwersję z fazy drożdżopodobnej do mycelialnej, przy czym okazało się, że zarówno komórki okrągłe jak i owalne mogą wytwarzać grzybnię. Odkrycie to umożliwiło zatwierdzenie jednego gatunku – *Malassezia furfur* w 1984 roku, zawierającego wcześniej opisywane stadia: *P. ovale*, *P. orbiculare* i *M. furfur* [68]. Kolejnym przełomem w taksonomii grzybów z rodzaju *Malassezia* były badania G u i l l o t i G u e h o w 1995 roku, które umożliwiły wyodrębnienie 7 gatunków *Malassezia*: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* [36]. W wyniku dalszych badań opisano kolejne gatunki: *M. dermatitis* (S u g i t a i w s p. 2002) [62], *M. equine* (N e l l i w s p. 2002) [52], *M. japonica* (S u g i t a i w s p. 2003) [61], *M. nana* (H i r a i i w s p. 2003) [40], *M. yamatoensis* (S u g i t a i w s p. 2004) [60], *M. caprae* (C a b a ñ e s i w s p. 2007) [18] oraz *M. cuniculi* (C a b a ñ e s i w s p. 2011) [19]. Obecnie obowiązującą pozycję taksonomiczną grzybów z rodzaju *Malassezia* przedstawiono w tabeli I.

3. Mikrobiologia grzybów z rodzaju *Malassezia*

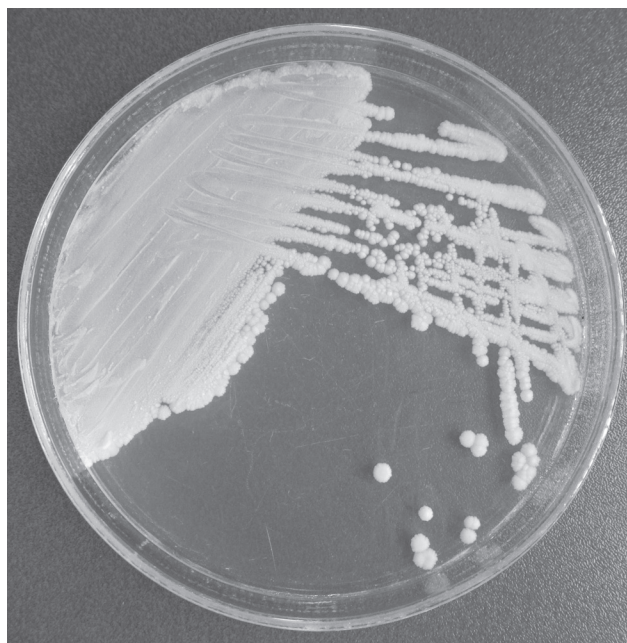
3.1. Charakterystyka ogólna

Malassezia sp. jako grzyby dimorficzne mogą występować w warunkach naturalnych zarówno w fazie mycelialnej jak i drożdżowej. W warunkach hodowlanych dominuje postać drożdżowa, przy czym opisywano również spontaniczne tworzenie formy mycelialnej przez niektóre gatunki *Malassezia* także w warunkach *in vitro* [23, 30, 51]. Zaobserwowano, że niektóre składniki podłoży mogą stymulować tworzenie grzybni przez *Malassezia* sp. D o r n i R o e h n e r t [30] obserwowali wzrost formy mycelialnej *Malassezia* sp. po dodaniu do podłoża glicyny, natomiast N a z z a r o i w s p. [51] uzyskali ten sam efekt wykorzystując cholesterol i estry cholesterolu. Rozmnażanie bezpłciowe grzybów z rodzaju *Malassezia* zachodzi przez pączkowanie drożdżowej komórki macierzystej.

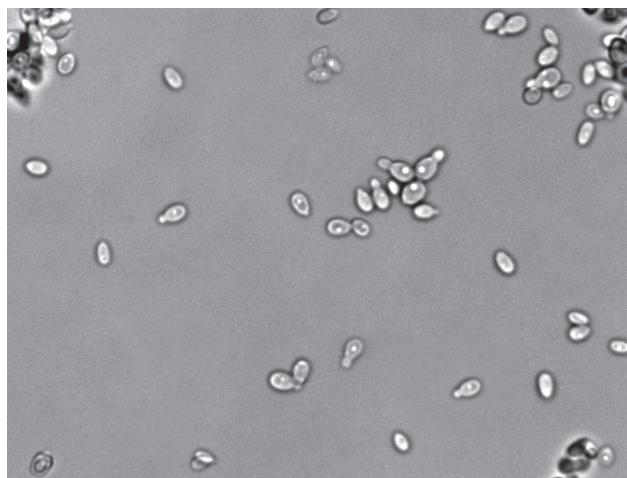
Ze względu na znaczne trudności w hodowli *Malassezia* sp., grzyby te w warunkach *in vitro* łatwo giną. (Jako, że grzyby z rodzaju *Malassezia* wymagają do wzrostu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, do hodowli używa się specjalnych podłoży agarowych, wg formuły D i x o n a lub L e e m i n g a - N o t m a n a, suplementowanych żółcią bydlęcą oraz oksyetylenowanymi estrami sorbitolu i kwasów tłuszczowych (tzw. Tween-y) [34]).

Kształt i wielkość komórek różnią się między poszczególnymi gatunkami. Rozmiar komórek waha się od ok. 1,5 do 8 μm . Również w wyglądzie kolonii są wyraźne różnice międzygatunkowe. Cechy morfologii kolonii i komórek grzybów *Malassezia* sp. stanowią kryteria diagnostyczne w identyfikacji gatunkowej (Rys. 1–2) (Tabela II).

Na poziomie ultrastrukturalnym, kluczową cechą charakteryzującą wszystkie podstawczaki (*Basidiomycota*) jest wielowarstwowa ściana komórkowa. Ściana grzybów *Malassezia* sp. jest jednak unikalna w królestwie grzybów. Jest znacznie grubsza (około 0,12 μm) niż ściana innych drożdży i zawiera znacząco większy odsetek tłuszczów w porównaniu na przykład z grzybami z rodzaju *Saccharomyces* (15–20% vs 1–2%). Ściana



Ryc. 1. Kolonie *Malassezia* sp. na podłożu Dixona po 10 dniach hodowli



Ryc. 2. Pączkujące komórki *Malassezia* sp. Preparat mikroskopowy z hodowli

Tabela II

Charakterystyka wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Malassezia*

Cecha	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. pachydermatis</i>
Morfologia kolonii	gładkie, miękkie, kruche	gładkie, miękkie, płaskie	szorstknie, serowate, kruche	pofałdowane, kruche	gładkie, nieregularne kruche	gładkie,	gładkie, miękkie, kruche, wypukłe
Barwa	kremowa	kremowa / beżowa	kremowa / beżowa	kremowa / beżowa	kremowa	kremowa	kremowa
Kształt, wielkość komórki	owalne, kuliste, średnica: 6 µm	kuliste, elipsoidalne, średnica: 2,5–5 µm	kuliste, średnica: 6–8 µm	cyldryczne długość: 1,5–3,5 µm	kuliste, owalne, średnica: 2–4 µm	cyldryczne długość: 4–6 µm	cyldryczne długość: 2,5–5 µm
Typ pączkowania	szeroka podstawa	sympodialne	wąska podstawa	szeroka podstawa	wąska podstawa	szeroka podstawa	szeroka podstawa
Wytwarzanie katalazy	+	+	+	+	+	–	zmiennie
Wytwarzanie ureazy	+	+	+	+	+	+	+
Wzrost w temp. 37°C	dobry	dobry	słaby	dobry	słaby	słaby	dobry
Max. temp. wzrostu [°C]	40–41	40–41	38	40–41	38	38	40–41
Asymilacja Tween 20	+	–	–	+	–	–	+
Asymilacja Tween 40 lub 60	+	+	–	+	–	–	+
Asymilacja Tween 80	+	+	–	–	–	–	+
Rozdział eskuliny	–	+	–	–	–	+	zmienny

Malassezia sp. ma wielowarstwową strukturę, w obrębie której wyróżnia się zewnętrzną powłokę o budowie lamelarnej, właściwą ścianę komórkową oraz błonę cytoplazmatyczną (nie należy do ściany komórkowej *sensu stricto*) o charakterystycznym pofałdowanym wzorze, widocznym w mikroskopie elektronowym. Głównymi składnikami ściany komórkowej *Malassezia* sp. są wielocukry – 70%, tłuszcze – 15–20% i białka – 10%. Struktura ściany komórkowej *Malassezia* sp. oraz wysoka odsetkowa zawartość lipidów odpowiadają najprawdopodobniej za znaczącą odporność *Malassezia* sp. na warunki zewnętrzne, w tym czynniki mechaniczne czy osmotyczne [4, 35, 59] oraz stanowią istotny czynnik wirulencji grzyba. Lipofilność ściany komórkowej *Malassezia* sp. ułatwia adhezję komórek grzyba do komórek gospodarza, utrudnia fagocytozę patogenu oraz hamuje odpowiedź zapalną [43, 50].

Liczba i kształt mitochondriów w każdej komórce *Malassezia* sp. wykazuje dużą zmienność. Jądro komórkowe posiada wyraźnie zaznaczoną błonę jądrową, otaczającą ziarna homogennej nukleoplazmy [59].

3.2. Genetyka

Badanie chromosomowego DNA grzybów z rodzaju *Malassezia* techniką pulsacyjnej elektroforezy żelowej (PFGE, *pulsed field gel electrophoresis*) wykazało istotne różnice międzygatunkowe zarówno w zakresie kariotypu, jaki i wielkości genomu (Tabela III) [11, 12].

Ogólnie, genom grzybów *Malassezia* sp. należy do najmniejszych spotykanych u grzybów wolno żyjących. Jego wielkość waha się między 6,4 a 14 Mbp. Liczba chromosomów wynosi od 5 w szczepach *M. pachydermatis* do 11 w szczepach *M. furfur*. Różna jest też zawartość par G+C rozpięta między 53,5% (*M. globosa*) a 68,7% (*M. slooffiae*).

Spośród 14 gatunków *Malassezia*, pełną sekwencję nukleotydową genomu ustalono jedynie dla *M. globosa* (szcep referencyjny CBS 7877) [67]. Genom *M. globosa* (8,9 Mbp) zawiera tylko 4.285 sekwencji kodujących białka, czyli mniej niż jakkolwiek inny poznany genom grzybów wolno żyjących. W genomie *M. globosa* stwierdza się także niewielką liczbę intronów (obecnych w 27% genów) oraz sekwencji repetytywnych (<0.8% wielkości genomu). Niewielki genom *M. globosa*, podob-

Tabela III

Wybrane właściwości genomu *Malassezia* sp.

Gatunek	Liczba chromosomów	Wielkość genomu [Mbp]	Zawartość par G+C [%]
<i>M. pachydermatis</i>	5	6,7–9,3	55,6
<i>M. furfur</i>	7–11	8,5–14	66,4
<i>M. globosa</i>	8	8,5–8,9	53,5
<i>M. obtusa</i>	6	7,4	60,7
<i>M. sympodialis</i>	7	6,4–7,8	62,2
<i>M. slooffiae</i>	7	8,6	68,7
<i>M. restricta</i>	9	8,0	59,9

nie jak innych gatunków z rodzaju *Malassezia*, traktuje się jako przejaw adaptacji tych grzybów do wzrostu w bardzo wąskiej niszy ekologicznej, tj. na skórze zwierząt ciepłokrwistych [22].

Cechą charakterystyczną genomu *M. globosa* jest nieobecność wielu genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych, w tym genów kodujących syntazę kwasów tłuszczowych (FAS), Δ^9 -desaturazę, czy izomerazę $\Delta^{2,3}$ -enoilo CoA. Braki te kompensowane są obecnością, występujących w wielu kopiach, genów kodujących sekrecyjne lipazy i fosfolipazy, umożliwiające asymilację kwasów tłuszczowych z zewnętrznych źródeł.

Analiza genomowa (i proteomiczna) wykazała, że genom *M. globosa* niesie geny kodujące białka podobne wszystkim dotąd opisanym białkom alergizującym *M. furfur* (Mala f2-4) i *M. sympodialis* (Mala s1, s5-13) [67].

W genomie *M. globosa* wykryto geny homologiczne do genów *TAM1* i *SIR1*, opisanych wcześniej dla głównej kukurydzy (*Ustilago maydis*), fitopatogenicznego grzyba, z którym – jak wykazała analiza porównawcza sekwencji genomowych – *M. globosa* dzieli wysokie pokrewieństwo filogenetyczne. Gen *TAM1* koduje aminotransferazę tryptofanową, enzym odpowiedzialny za przekształcenie tryptofanu do pirogronianu indolu, którego pochodne wykrywa się w szczepach *M. furfur*. Te barwne związki (pigmenty, m. in. pityriarubiny, pityrialakton, malassezyna) wykazują różne działanie biologiczne, które wiąże się ze zmianami zabarwienia skóry w przebiegu łupieżu pstrego. W powstawaniu barwnych pochodnych indolowych uczestniczy też enzym reduktaza siarczynowa. Mutacje w kodującym ją genie *SIR1* znacząco ograniczają tworzenie się tych związków [70].

W końcu, mimo, że grzyby *Malassezia* sp. znane są wyłącznie jako formy anamorficzne (haploidalne, rozmnażające się bezpłciowo), analiza sekwencyjna genomu *M. globosa* pozwoliła zidentyfikować region genetyczny (*MAT*, *mating type locus*) związany z rozmnażaniem płciowym tych grzybów. W obrębie omawianego locus wykryto geny kodujące feromony, ich błonowe receptory oraz homeodomenowe czynniki transkrypcyjne [67].

3.3. Metabolizm

Z wyjątkiem *M. pachydermatis*, wszystkie poznane gatunki *Malassezia* są lipidozależne, tj. wymagają zewnętrznych źródeł lipidów do wzrostu. Zapotrzebowanie *Malassezia* sp. na tłuszcze zaobserwowano po raz pierwszy już w 1939 roku [10]. Obecnie wiadomo, że lipidozależność *Malassezia* sp. wynika z braku zdolności syntezy kwasu mirystynowego, który stanowi prekursor długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [57]. Skład lipidowy *Malassezia* sp. jest zmienny i w dużej mierze zależy od źródła dostępnych tłuszczów. *Malassezia* sp.

najczęściej wykorzystują trójglicerydy, wolne kwasy tłuszczowe oraz estry kwasów tłuszczowych. Opisano również asymilację fosfolipidów oraz cholesterolu i estrów cholesterolu [25].

Wiedza na temat metabolizmu grzybów z rodzaju *Malassezia*, z wyjątkiem metabolizmu lipidów, jest ograniczona. Z uwagi na lipidozależność większości gatunków, wyniki testów asymilacji węglowodanów znane są wyłącznie dla *M. pachydermatis*. Wykazano, że gatunek ten ma zdolność wykorzystywania jako źródło węgla mannitolu, sorbitolu i glicerolu. Żaden z gatunków *Malassezia* nie fermentuje cukrów. Wzrost tych grzyby nie zależy również od obecności w podłożu witamin [10, 48]. Jako źródło siarki *Malassezia* sp. najczęściej wykorzystują metioninę, rzadziej cystynę i cysteinę, natomiast źródło azotu mogą stanowić zarówno organiczne (różne aminokwasy) jak i nieorganiczne związki, przy czym *Malassezia* nie asymilują azotanów potasu [48].

W warunkach naturalnych i standardowej hodowli *Malassezia* sp. rosną tlenowo. Mogą jednak tolerować również warunki mikroaerofilne lub nawet beztlenowe [31].

3.4. Aktywność enzymatyczna

Brak zdolności syntetyzowania własnych kwasów tłuszczowych przez *Malassezia* sp. i konieczność wykorzystywania zewnętrznych źródeł lipidów znajduje swoje odzwierciedlenie w produkcji licznych zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, w tym lipaz oraz fosfolipaz.

Badania dotyczące właściwości lipolitycznych grzybów z rodzaju *Malassezia* są prowadzone od wielu lat. Już w 1978 roku C a t t e r a l l i wsp. wykazali obecność zewnątrzkomórkowej lipazy w warunkach *in vitro* [21]. W badaniach przeprowadzonych w latach 90. ubiegłego wieku M a y s e r i wsp. zaobserwowali istotne różnice w aktywności lipolitycznej między poszczególnymi gatunkami *Malassezia* oraz zróżnicowanie w asymilacji odmiennych kwasów tłuszczowych [46, 47]. W badaniu wykazano znacząco szybszy wzrost *Malassezia* sp. po dodaniu do podłoża nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z nasyconymi kwasami tłuszczowymi. Różnice w aktywności lipolitycznej grzybów z rodzaju *Malassezia* wykorzystane zostały do opracowania testów diagnostycznych (testy asymilacji „Tweenów”, czy kremoforu EL), które stanowią obecnie ważne kryterium klasyfikacji gatunkowej *Malassezia* sp. (Tabela II) [47].

W 2006 roku B r u n k e i H u b e po raz pierwszy sklonowali i w pełni scharakteryzowali gen lipazy *M. furfur* i opisali go jako *MfLIP1* [14]. *MfLIP1* składa się 1464 par zasad i koduje enzym o masie cząsteczkowej 54,3 kDa. Maksymalną aktywność lipazy obserwowano w temperaturze 40°C, a optymalne dla niej pH

wynosiło 5,8. Badany enzym hydrolizował Tween'y, a także wykazywał nieznaczną aktywność fosfolipazy. W niedługim czasie po MfLIP1 wykryto geny dwóch kolejnych lipaz: gen lipazy sekrecyjnej *M. pachydermatis*, kodujący enzym o aktywności esterazy i masie cząsteczkowej 48,1 kDa oraz optymalnym pH 7,5 [54] oraz gen *LIP1* kodujący lipazę *M. globosa* – enzym o masie cząsteczkowej 32 kDa i optymalnym pH 5,5 [27]. W warunkach *in vitro*, oczyszczona, rekombinowana lipaza *M. globosa* hydrolizowała monoglicerydy i dwuglicerydy, a nie rozkładała trójglicerydów, natomiast w badaniach enzymatycznych z wykorzystaniem hodowli *M. globosa* wykazano również hydrolizę trójglicerydów, co wskazywało na obecność dodatkowych lipaz u *M. globosa*. Jak już wspomniano, analiza sekwencyjna genomu *M. globosa* wykazała obecność wielu kopii genów kodujących zewnątrzkomórkowe hydrolazy, w tym 14 lipaz, 9 fosfolipaz, 2 oksydoreduktaz cholinowych, sfingomielinaz i licznych proteaz, ulegających ekspresji w momencie kolonizacji tkanek gospodarza przez grzyb [67]. Według wielu badaczy aktywność lipolityczna *Malassezia* sp. jest jednym z podstawowych czynników prowadzących do rozwoju łupieżu i łojotokowego zapalenia skóry. Hydrolizując trójglicerydy grzyby *Malassezia* sp. uwalniają wolne kwasy tłuszczowe, które stanowią istotny czynnik drażniący i nasilający reakcję zapalną w tkankach gospodarza [55].

Zdolność produkcji fosfolipaz i aktywacja kaskady kwasu arachidonowego może stanowić dodatkowy czynnik prowadzący do uszkodzenia tkanek gospodarza w przebiegu infekcji *Malassezia* sp. Wytwarzanie fosfolipaz przez grzyby z rodzaju *Malassezia* zaobserwowano zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* w hodowlach linii komórkowych Hep-2, przy czym stwierdzono, że szczepy patogenne *Malassezia* sp. wykazują znacząco większą aktywność fosfolipazy [53]. Cafarchia i Ontranto w badaniach nad szczepami *M. pachydermatis* izolowanymi od psów ze zmianami grzybiczymi i zdrowych zaobserwowali, że szczepy *M. pachydermatis* pochodzące ze zmian skórnych znacząco częściej wykazywały aktywność fosfolipazy od szczepów izolowanych ze skóry psów zdrowych (94% versus 10,6%) [20].

Grzyby *Malassezia* sp. produkują również enzymy o właściwościach lipooksygenazy i lipoperoksydazy. Zwiększony poziom nadtlenków lipidowych i ich pochodnych obserwowano w skórze chorobowo zmienionej u pacjentów z łupieżem pstrym oraz w warunkach *in vitro* po dodaniu do podłoża hodowlanego dla *Malassezia* sp. wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Badacze sugerują, że depigmentacja skóry u pacjentów z łupieżem pstrym może wynikać z uszkodzenia błon komórkowych melanocytów przez nadtlenki lipidowe. Lipoperoksydaza *Malassezia* sp. dotychczas nie została wyizolowana [26].

4. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z innymi mikroorganizmami

Grzyby z rodzaju *Malassezia* uwalniają różne metabolity o działaniu sprzyjającym lub hamującym kolonizację innymi mikroorganizmami, przy czym antagonistyczna aktywność szczepów *Malassezia* sp. wykazuje dużą zmienność gatunkową. W badaniach rosyjskich autorów najbardziej aktywnym antagonistycznie gatunkiem i równocześnie najmniej wrażliwym na działanie metabolitów innych szczepów był gatunek *M. furfur*. Związki uwalniane przez *M. furfur* znacząco hamowały wzrost grzybów należących do klasy *Ascomycetes* (*Geotrichum* sp., *Candida albicans*) i w mniejszym stopniu drożdży należących do klasy *Basidiomycetes* (*Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula aurantica*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon ovoides*) [2].

5. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z układem immunologicznym

5.1. Serologia i budowa antygenowa

Grzyby z rodzaju *Malassezia* mają złożoną budowę antygenową. Obecnie, za pomocą technik immunoelektroforetycznych wykazano obecność ponad 80 antygenów o budowie białkowej i cukrowej u poszczególnych gatunków *Malassezia* sp. Antygeny białkowe są w większości składnikami ściany komórkowej lub cytoplazmy i ulegają ekspresji we wczesnych fazach wzrostu grzyba. Antygeny wielocukrowe (głównie mannany) oraz cząsteczki o budowie glikoprotein (głównie mannoproteiny), są trudniejsze do wykrycia i występują podczas całego cyklu rozwojowego komórki [3, 4].

Pierwszy antygen *Malassezia* – Mala f1 – został opisany i zsekwencjonowany w 1997 roku. Mala f1 to białko o masie 36 kDa, zawierające 22 aminokwasy i występujące na powierzchni komórki grzyba. Reaktywność rekombinowanego Mala f1 była porównywalna z naturalnie występującym antygenem [4]. Kolejne opisane antygeny: Mala f2 i Mala f3 to cząsteczki o masie, odpowiednio 21 kDa i 20 kDa, wykazujące około 50% homologii sekwencji aminokwasowych. Zaobserwowano również homologię między Mala f2 i Mala f3 a białkami błonowymi *Candida boidinii* i jednym z alergenów *Aspergillus fumigatus* [4]. Antygen Mala f4 stanowi istotny alergen dla pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, u których występuje kolonizacja *Malassezia* sp. Surowica pacjentów z AZS wykazuje swoistą reakcję z Mala f4 w 80% przypadków. Białko Mala f4 ma masę 35 kDa i wykazuje 57% homologii z mitochondrialną dehydrogenazą maleinową *Saccharomyces cerevisiae*. Kolejne antygeny białkowe: Mala f6, Mala f7, Mala f8

i Mala f9 oraz glikoproteinowy antygen *M. globosa* również reagują swoiście z surowicą pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, co sugeruje ich rolę jako czynników alergizujących. Produkowane obecnie zestawy rekombinowanych antygenów *Malassezia* sp. są najczęściej wykorzystywane w punktowych testach skórnych (*skin prick test*, SPT). W badaniach klinicznych zaobserwowano, że znacząco większy odsetek pacjentów z AZS ma pozytywne wyniki SPT z antygenami *Malassezia* sp. w porównaniu z pacjentami zdrowymi lub osobami z innymi chorobami dermatologicznymi związanymi z obecnością grzybów z rodzaju *Malassezia*, przy czym najwięcej dodatnich wyników testów obserwuje się w grupie pacjentów z AZS ze zmianami skórnymi zlokalizowanymi na głowie i szyi [3, 4].

Zróznicowanie opisywanych przez poszczególnych badaczy antygenów jest bardzo duże – od drobnych białek do wielkocząsteczkowych glikoprotein. Niektóre z nich, o podobnej masie cząsteczkowej mogą, w wyniku dalszych badań, okazać się identyczne. Ekspresja poszczególnych antygenów *Malassezia* sp. zależy w dużej mierze od czasu hodowli grzyba. Zaobserwowano również, że wiele antygenów wiążących IgE jest labilnych w temperaturze pokojowej lub wyższej i ulega degradacji po około miesiącu przechowywania [3, 4].

Przeciwciała w klasie IgE swoiste dla *Malassezia* sp. obserwowano w przypadku 20–100% pacjentów z AZS, jednak jak dotąd nie stwierdzono większej korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał i stopniem nasilenia objawów klinicznych [4, 37, 56].

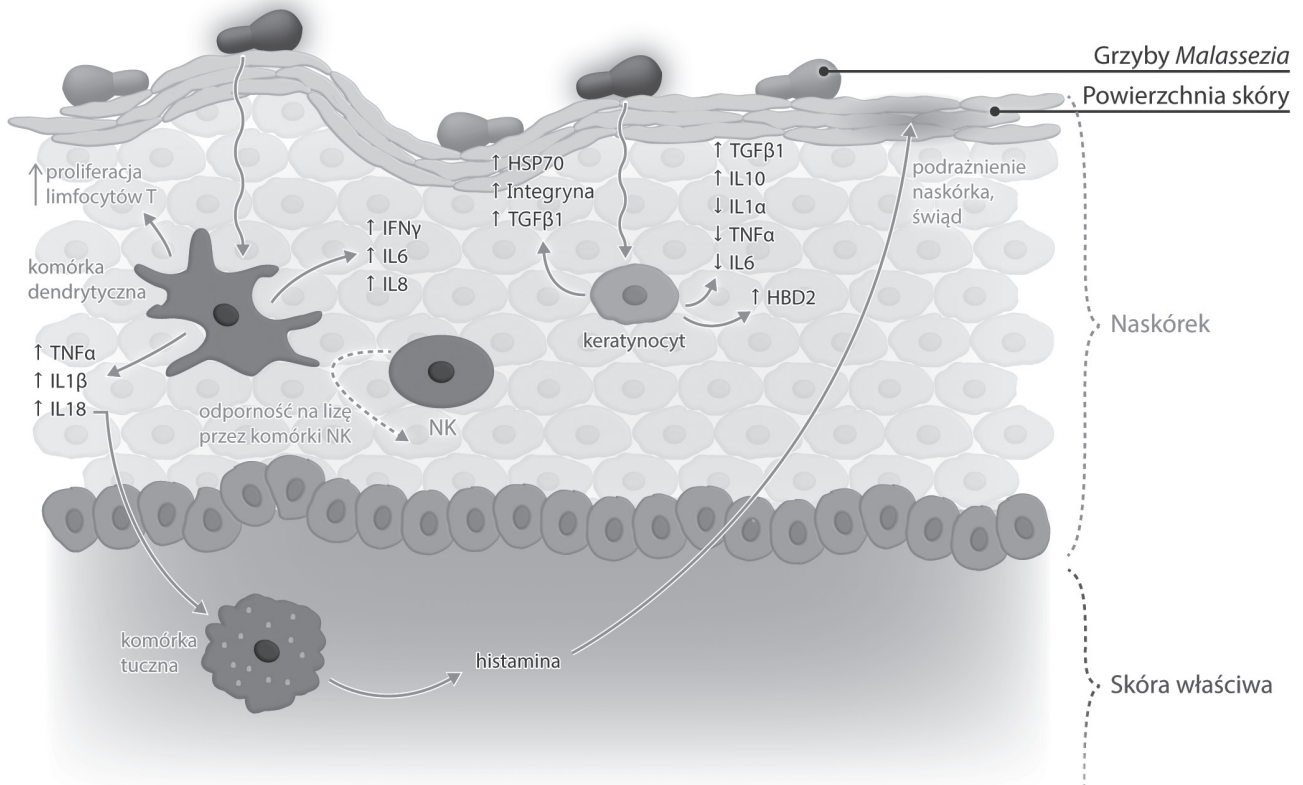
5.2. Interakcje grzybów z rodzaju *Malassezia* sp. z układem dopełniacza

Grzyby z rodzaju *Malassezia* mają zdolność aktywacji kaskady dopełniacza zarówno na drodze klasycznej, jak i alternatywnej. Alternatywna droga aktywacji dopełniacza zależy od stężenia komórek grzybiczych i czasu stymulacji. Cząsteczką najprawdopodobniej odpowiedzialną za aktywację drogi alternatywnej jest β -glukan ściany komórkowej *Malassezia* sp. Stymulacja klasycznej drogi aktywacji dopełniacza również zależy od czasu i stężenia komórek grzybiczych, przy czym większe znaczenie mają komórki martwe niż żywe. Zdolność aktywacji dopełniacza przez *Malassezia* sp. może stanowić jeden z mechanizmów powstawania stanu zapalnego u pacjentów z łojotokowym zapaleniem skóry (SD). W badaniach immunohistochemicznych wycinków pobieranych ze zmian skórnych w przebiegu SD wykazano odkładanie się fragmentów C3 dopełniacza wokół komórek *Malassezia* sp. W wycinkach ze skóry niezmięnionej nie stwierdzano obecności białka C3 [4].

5.3. Wpływ grzybów *Malassezia* sp. na różne populacje komórek w skórze

Interakcje między komórkami *Malassezia* sp. a układem odpornościowym człowieka są przedmiotem badań od wielu lat. W latach 90. ubiegłego wieku oceniano głównie swoistą odpowiedź humoralną i komórkową na podstawie zmian we krwi obwodowej u pacjentów z chorobami związanymi z obecnością grzybów z rodzaju *Malassezia*. Wyniki przeprowadzonych badań były często rozbieżne. Od kilku lat badacze skupiają się głównie na ocenie interakcji między komórkami *Malassezia* sp. i różnymi populacjami komórek obecnych w skórze (Rys. 3).

Watanabe i wsp. jako pierwsi badali relacje między grzybami z rodzaju *Malassezia* i keratynocytami, stanowiącymi naliczniejszą populację komórek w naskórku i pełniącymi funkcję zarówno strukturalną jak i immunologiczną [65]. W badaniu wykorzystano komórki *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae* oraz *M. sympodialis*. W supernatancie z hodowli komórkowej składającej się z keratynocytów i komórek grzybiczych w proporcji 1:1 oceniano stężenie IL1 β , IL6, IL8, TNF α oraz białka chemotaktycznego monocytów (MCP1). Hodowlę komórkową prowadzono przez 24 godziny, przy czym poziom badanych cytokin oceniano w odstępach jednogodzinnych od pierwszej do 24 godziny. Poziom MCP1 w przypadku wszystkich badanych gatunków był niski lub niewykrywalny. W supernatancie z hodowli *M. furfur* również nie stwierdzono obecności pozostałych cytokin, lub poziom ich był bardzo niski. Najwyższe stężenie cytokin obserwowano w supernatancie z hodowli *M. pachydermatis*, co może tłumaczyć większe nasilenie reakcji zapalnej w przebiegu infekcji *M. pachydermatis* u zwierząt w porównaniu z objawami u ludzi. W kolejnym badaniu, przeprowadzonym w 2001 roku, Baroni i wsp. zaobserwowali zmniejszenie produkcji IL1 α oraz zwiększenie wydzielania IL10 i TGF β 1 przez keratynocyty pod wpływem *M. furfur*, co prowadziło do zahamowania wydzielania IL6 i TNF α [8]. Komórki *Malassezia* były wchłaniane przez keratynocyty, ale zabijane tylko w niewielkim odsetku. Badacze postulowali, że supresja wydzielania IL1 α , IL6 i TNF α przez *Malassezia* sp. pozwala przetrwać komórkom grzyba w komórkach gospodarza bez wywoływania reakcji zapalnej. Zahamowanie wydzielania IL1 β , IL6 i TNF α przez jednojądrzaste leukocyty krwi obwodowej (PBMNC) w hodowli z komórkami *Malassezia* sp. wykazał Kesavan w 1998 roku [44]. Również w tym badaniu zaobserwowano, że supresja produkcji cytokin prozapalnych zależała od IL10. Immunosupresyjny wpływ grzybów z rodzaju *Malassezia* na keratynocyty w warunkach *in vitro* potwierdzono w kolejnym badaniu przeprowadzonym w 2004 roku [29]. Donnarumma i wsp. po inkubacji komórek

Ryc. 3. Interakcje grzybów *Malassezia* sp. z komórkami skóry gospodarza

M. furfur z keratynocytami w proporcji 30:1 zaobserwowali zwiększoną ekspresję genów dla IL10, TGFβ1 oraz genu ludzkiej β defensyny (HBD2) w keratynocytach. Obecnie sugeruje się, że immunosupresyjny wpływ *Malassezia* sp. na keratynocyty tłumaczy ich występowanie na skórze jako komensali oraz może stanowić przyczynę niewielkiego odczynu zapalnego w przebiegu łupieżu pstrego, mimo masywnej kolonizacji skóry przez *Malassezia* sp. [66]. Immunosupresyjny efekt wywołany przez *Malassezia* sp. na PBMNC udało się odwrócić pozabawiając komórki grzyba lipidowej otoczki, stąd wydaje się, że to właśnie lipidy odpowiadają za immunomodulujący wpływ *Malassezia* sp. [3].

W badaniu przeprowadzonym w 2004 roku Baroni i wsp. oceniali wpływ *Malassezia* sp. na keratynocyty u pacjentów z łuszczycą zwyczajną [7]. Badacze zaobserwowali znaczący wzrost ekspresji cząsteczek zaangażowanych w hyperproliferyację i migrację komórek (HSP 70, integryna, TGFβ1) w keratynocytach pobranych z wycinków skórnych ze zmian łuszczycowych po inkubacji z komórkami *Malassezia* sp. w porównaniu z keratynocytami ze skóry osób zdrowych. W przypadku, gdy zmiany łuszczycowe były dodatkowo skolonizowane przez *Malassezia* sp. ekspresja badanych białek była większa. Nasilenie hyperproliferyacji keratynocytów przez *Malassezia* sp. u pacjentów z łuszczycą może przyczyniać się do zaostrzenia choroby podstawowej i powodować utrzymywanie się zmian skórnych [3, 7].

Interakcje pomiędzy grzybami z rodzaju *Malassezia* i komórkami dendrytycznymi były przedmiotem licznych badań od 2000 roku. Większość badaczy oceniała wpływ *Malassezia* sp. na komórki Langerhansa w zmianach skórnych u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Buentke i wsp. w badaniu przeprowadzonym w 2000 roku badali zdolność komórek dendrytycznych CD 1a (+) izolowanych z krwi obwodowej do wychwytywania całych komórek *M. furfur*, różnych fragmentów komórek grzyba oraz rekombinowanego antygeny Mafa 5 [16]. W badaniu wykazano, że niedojrzałe komórki dendrytyczne znacząco efektywniej niż komórki dojrzałe wychwytywały komórki *Malassezia* sp., głównie na drodze endocytozy zależnej od receptora mannozowego. Endocytoza antygenów grzybiczych indukowała dojrzewanie komórek dendrytycznych skutkując również wzmoczoną produkcją TNFα, IL1β oraz IL18. Dojrzałe komórki dendrytyczne stymulowały następnie proliferację autologicznych limfocytów T. W kolejnym badaniu, ci sami autorzy oceniali interakcje pomiędzy komórkami dendrytycznymi i komórkami NK (natural killer) w obecności grzybów z rodzaju *Malassezia* [15]. Buentke i wsp. zaobserwowali, że w wycinkach pobranych ze zmian skórnych u pacjentów z AZS liczba komórek NK jest znacznie większa, niż w skórze pacjentów zdrowych. Badacze inkubowali komórki dendrytyczne z grzybami *Malassezia* sp. przez 46 godzin, a następnie oceniali stopień lizy komórek dendrytycz-

nych zależnej od komórek NK. Badanie wykazało, że inkubacja komórek dendrytycznych z komórkami *Malassezia* sp. ma działanie protekcyjne znacząco zmniejszając podatność na lizę komórek dendrytycznych i dodatkowo stymuluje produkcję IL8, IL6 czy IFN γ . Autorzy sugerują, że dojrzałe komórki dendrytyczne prezentujące antygeny *Malassezia* sp. limfocytom T, odporne na lizę przez komórki NK mogą przyczynić się do podtrzymania reakcji zapalnej w zmianach skórnych pacjentów z AZS, co dodatkowo jest jeszcze nasilane przez produkowane przez komórki dendrytyczne cytokiny prozapalne [15]. Gabrielsson i wsp. wykazali, że komórki dendrytyczne pobrane od pacjentów z AZS reagują odmiennie na inkubację z komórkami *Malassezia* sp. niż komórki dendrytyczne pacjentów zdrowych [32]. W badaniu zaobserwowano pięciokrotny wzrost ekspresji genów dla IL8, CD54, CD83, receptora IL1, BTG1 (*B-cell translocation gene 1*) i MDC (*monocyte derived chemokine*) w komórkach dendrytycznych pacjentów z AZS po inkubacji z *M. sympodialis* w porównaniu z ekspresją genów w komórkach dendrytycznych osób z grupy kontrolnej, co może tłumaczyć odmienną rolę *Malassezia* sp. w tych grupach [32].

6. Podsumowanie

Dokładne poznanie mechanizmów immunomodulacyjnych grzybów z rodzaju *Malassezia* wymaga jeszcze wielu badań. Dane dostępne obecnie sugerują, że u osób ze zdrową skórą (z prawidłową barierą skórno-naskórkową) grzyby *Malassezia* sp. wywierają efekt immunosupresyjny, co pozwala im przetrwać w roli rganizmów komensalnych, natomiast w przypadku pacjentów z łuszczycą lub atopowym zapaleniem skóry grzyby stymulują odpowiedź zapalną, która nasila przebieg choroby podstawowej i przyczynia się do podtrzymywania zmian skórnych [3].

Podziękowania

Autorzy składają podziękowania Panu dr. Pawłowi Krzyściakowi z Zakładu Mykologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za użyczenie zdjęć hodowli *Malassezia* sp., a także Panu Jakubowi Pawłotowi za udostępnienie ryciny ilustrującej oddziaływanie międzykomórkowe w przebiegu zakażania grzybami *Malassezia* sp.

Piśmiennictwo

1. Adamski Z.: Badania nad rolą drożdżaków lipofilnych *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*, *Pityrosporum orbiculare*) w różnych dermatozach. Rozprawa habilitacyjna, AM w Poznaniu, 1995, s. 1–102.
2. Arzumanyan V.G., Sergeev A.Y., Shelemekh O.V., Ojovan I.M., Serdiuk O.A.: Antagonistic activity of *Malassezia* spp. towards

- other clinically significant yeast genera. *Bull. Exp. Biol. Med.* **148**, 410–415 (2009)
3. Ashbee H.R.: Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 14–23 (2006)
4. Ashbee H.R., Evans V.: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 21–57 (2002)
5. Back O., Scheynius A., Johansson S.G.: Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 448–451 (1995)
6. Baker B.S., Bokth S., Powles A., Garioch J.J., Lewis H., Valdimarsson H., Fry L.: Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttae psoriatics lesion. *Br. J. Dermatol.* **128**, 493–499 (1993)
7. Baroni A., Paoletti I., Ruocco E., Agozzino M., Tufano M.A., Donnarumma G.: Possible role of *Malassezia furfur* in psoriasis: modulation of TGF-beta1, integrin, and HSP70 expression in human keratinocytes and in the skin of psoriasis-affected patients. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 35–42 (2004)
8. Baroni A., Perfetto B., Paoletti I., Ruocco E., Canozo N., Orlando M., Buommino E.: *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression. *Arch. Dermatol. Res.* **293**, 414–419 (2001)
9. Batra R., Boekhout T., Guého E., Cabañes F.J., Dawson T.L. Jr, Gupta A.K.: *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1101–1113 (2005)
10. Benham R.W.: The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* – a lipophilic fungus. *J. Invest. Dermatol.* **2**, 187–203 (1939)
11. Boekhout T., Bosboom R.: Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic and epidemiological implications. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 146–153 (1994)
12. Boekhout T., Kamp M., Guého E.: Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.* **36**, 365–372 (1998)
13. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H., Burgdorf W.: Erythematopapulo-squamous diseases. [w:] *Dermatology*. Springer Verlag, Berlin, 2000, s. 585–608.
14. Brunke S., Hube B.: MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology*, **152**, 547–554 (2006)
15. Buentke E., Heffler L.C., Wilson J.L., Wallin R.P., Löfman C., Chambers B.J., Ljunggren H.G., Scheynius A.: Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin – *Malassezia*-influenced cell interaction. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 850–857 (2002)
16. Buentke E., Zargari A., Heffler L.C., Avila-Cariño J., Savolainen J., Scheynius A.: Uptake of the yeast *Malassezia furfur* and its allergenic components by human immature CD1a+ dendritic cells. *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 1759–1770 (2000)
17. Cabañes F.J., Theelen B., Castellá G., Boekhout T.: Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1064–1076 (2007)
18. Cabañes F.J., Theelen B., Castellá G., Boekhout T.: Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1064–1076 (2007)
19. Cabañes, F.J., Vega S., Castellá G.: *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med. Mycol.* **49**, 40–48 (2011)
20. Cafarchia C., Otranto D.: Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4868–4869 (2004) 53
21. Catterall M.D., Ward M.E., Jacobs P.: A reappraisal of the role of *Pityrosporum orbiculare* in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. *J. Invest. Dermatol.* **71**, 398–401 (1978)

22. Chen T.-A., Hill P.B.: The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* **16**, 4–26 (2005)
23. Civilia E.S., Vignale R., Sanjines A., Conti-Diaz I.A.: Hyphal production by *Pityrosporum ovale*. *Int. J. Dermatol.* **17**, 74–77 (1978)
24. Clemmensen O., Hjorth N.: Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type I sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*. *Sem. Dermatol.* **2**, 26–29 (1983)
25. Dawson T.L. Jr.: *Malassezia globosa* and *restricta*: Breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **12**, 15–19 (2007)
26. De Luca C., Picardo M., Breathnach A., Passi S.: Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. *Exp. Dermatol.* **5**, 49–56 (1996)
27. DeAngelis Y.M., Dawson T.L. Jr i wsp.: Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIPI. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2138–2146 (2007)
28. Diaz M.R., Boekhout T., Theelen B., Bovers M., Cabañes F.J., Fell J.W.: Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1197–1209 (2006)
29. Donnarumma G., Paoletti I., Buommino E., Orlando M., Tufano M.A., Baroni A.: *Malassezia furfur* induces the expression of beta-defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Arch. Dermatol. Res.* **295**, 474–481 (2004)
30. Dorn M., Roehnert K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 244–248 (1977)
31. Faergemann J., Bernander S.: Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. *Sabouradia*, **19**, 117–121 (1981)
32. Gabrielsson S., Buentke E., Liedén A., Schmidt M., D'Amato M., Tengvall-Linder M., Scheynius A. *Malassezia sympodialis* stimulation differently affects gene expression in dendritic cells from atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Acta Dermatol. Venereol.* **84**, 339–345 (2004)
33. Gueho E., Midgley G., Guillot J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 337–55 (1996)
34. Guého-Kellermann E., Boekhout T., Begerow D.: Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. [w:] Boekhout T., Guého E., Mayser P., Velegaki A. (red.) *Malassezia* and the skin. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. str. 17–64.
35. Guillot J., Gueho E., Prevost M.C.: The ultrastructure of dimorphic yeast *Malassezia furfur*. *J. Mycol. Méd.* **5**, 86–91 (1995)
36. Guillot J., Gueho E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek*, **67**, 297–314 (1995)
37. Gupta A.K., Batra R., Bluhm R., Boekhout T., Dawson T.L. Jr: Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J. Am. Acad. Dermatol.* **51**, 785–798 (2004)
38. Hay R.J., Midgley G.: Introduction: *Malassezia* yeasts from a historical perspective. [w:] Boekhout T., Guého E., Mayser P., Velegaki A. (red.) *Malassezia* and the skin. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010 s. 1–16.
39. Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H., Hasegawa A.: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 623–627 (2004)
40. Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H., Hasegawa A.: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 623–627 (2004)
41. Jabłońska S., Majewski S.: Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005, s. 1–528.
42. Katsarou A., Armenaka M.C.: Atopic dermatitis in older patients: particular points. *JEADV*, **25**, 12–18 (2011)
43. Kesavan S., Holland K., Cunliffe W., Ingham E.: The effects of de-lipidisation on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 389A (1997)
44. Kesavan S.: Immunomodulation by *Malassezia* spp. PhD thesis. University of Leeds, Leeds, 1998.
45. Lindgren L., Wahlgren C.F., Johansson S.G., Wiklund I., Nordvall S.L. Occurrence and clinical features of sensitization to *Pityrosporum orbiculare* and other allergens in children with atopic dermatitis. *Acta Dermatol. Venereol.* **75**, 300–304 (1995)
46. Mayser P., Fuhrer D., Schmidt R., Grunder K.: Hydrolysis of fatty acid esters by *Malassezia furfur*: different utilization depending on alcohol moiety. *Acta Dermatol. Venereol.* **75**, 105–109 (1995)
47. Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Pickel M., Gruender K., Gueho E.: Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J. Dermatol.* **137**, 208–213 (1997)
48. Mayser P., Imkamp A., Winkler M., Papavassilis C.: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* **290**, 277–282 (1998)
49. Mayser P., Schutz M., Schuppe H.C., Jung A., Schill W.B.: Frequency and spectrum of *Malassezia* yeasts in the area of prepuce and glans penis. *BJU Int.* **88**, 554–558 (2001)
50. Mittag H.: Fine structural investigations of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses*, **38**, 13–21 (1995)
51. Nazzaro P.M., Passi S., Caprilli F., Mercantini R.: Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 531–534 (1977)
52. Nell A., James S.A., Bond C.J., Hunt B., Herrtage M.E.: Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *Vet. Rec.* **150**, 395–398 (2002)
53. Plotkin L.I., Mathov I., Squiquera L., Leoni J.: Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A₂: A potential pathophysiological mechanism. *Mycology*, **90**, 163–169 (1998)
54. Plotkin L.I., Squiquera L., Mathov I., Galimberti, R. Leoni J.: Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**, 43–48 (1996)
55. Ro B.I., Dawson T.L. Jr: The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **10**, 194–197 (2005)
56. Savolainen J., Lintu P., Kosonen J., Kortekangas-Savolainen O., Viander M., Pène J., Kalimo K., Terho E.O., Bousquet J.: *Pityrosporum* and *Candida* specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin. Exp. Allergy*, **31**, 125–134 (2001)
57. Shifrine M., Marr A.G.: The requirement of fatty acids by *P. ovale*. *J. Gen. Microbiol.* **32**, 263–70 (1963)
58. Silny W., Czarnecka-Operacz M.: Atopowe zapalenie skóry – udział limfocytów T i komórek Langerhansa w rozwoju zmian skórnych. *Alerg. Astm. Immunol.* **5**, 15–20 (2000)
59. Simmons R.B., Ahearn D.G.: Cell wall ultrastructure and diammonium blue B reaction of *Sporopachyderma quercuum*, *Bullera tsugae* and *Malassezia* spp. *Mycologia*, **79**, 38–43 (1987)
60. Sugita T, Tajima M, Takashima M., Amaya M., Saito M., Tsuboi R., Nishikawa A.: A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* **48**, 579–583 (2004)

61. Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R., Nishikawa A.: Description of a new yeast species, *Malasseziajaponica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4695–4699 (2003)
62. Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H., Nishikawa A.: New yeast species, *Malassezia dermatitis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1363–1367 (2002)
63. Van de Kerkhof P.C., Franssen M.E.: Psoriasis of the scalp: diagnosis and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 159–165 (2001)
64. Wanat-Krzak M., Kurzawa R.: Atopowe zapalenie skóry – etiopatogeneza, diagnostyka i leczenie. *Alergologia i pulmonologia wieku dziecięcego. Klin. Pediatr.* **10**, 237–244 (2002)
65. Watanabe S., Kano R., Sato H., Nakamura Y., Hasegawa A.: The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 769–773 (2001)
66. Wroblewski N., Bär S., Mayser P.: Missing granulocytic infiltrate in *pityriasis versicolor* – indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen? *Mycoses*, **48**, 66–71 (2005)
67. Xu J., Dawson T.L. Jr i wsp.: Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18730–18735 (2007)
68. Yarrow D., Ahearn D.G. *Malassezia* Baillon. [w:] The yeasts. A taxonomic study. Wyd. 3. NJW Kroger van Rij (red.), North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1984, s. 882–885.
69. Zawirska A.: Grzyby z rodzaju *Malassezia*. Nowe informacje. *Post. Derm. Alergol.* **2**, 97–103 (2004)
70. Zuther K., Mayser P., Hettwer U., Wu W., Spitteller P., Kindler B.L., Karlovsky P., Basse C.W., Schirawski J.: The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **68**, 152–172 (2008)

Elżbieta Rup^{2†}, Tomasz Jagielski^{1*†}, Anna Macura², Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
²Zakład Mykologii, Katedra Mikrobiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

Spis treści: 1. Występowanie i chorobotwórczość grzybów z rodzaju *Malassezia*. 1.1. Dystrybucja grzybów z rodzaju *Malassezia*. 1.2. Chorobotwórczość grzybów *Malassezia* sp. 1.2.1. Łupież pstry (*Pityriasis versicolor*, PV). 1.2.2. Zapalenie mieszków włosowych (*Malassezia folliculitis*). 1.2.3. Łojotokowe zapalenie skóry i łupież (*Seborrhoeic dermatitis/Dandruff*; SD/D). 1.2.4. Atopowe zapalenie skóry. 1.2.5. Łuszczyca. 2. Wrażliwość na leki grzybów z rodzaju *Malassezia*. 3. Przyszłość badań nad grzybami z rodzaju *Malassezia*

Characterization of fungi of the *Malassezia* genus. II. Clinical aspects

Piśmiennictwo: Lipophilic yeasts of the genus *Malassezia* have been associated with a number of diseases affecting human skin. Clinically, pityriasis versicolor is the most important, ranking the first among all cutaneous mycoses in human population worldwide. *Malassezia* fungi may also aggravate the symptoms of other skin disorders, such as seborrheic dermatitis or exacerbate the course of psoriasis and atopic dermatitis. This review briefly outlines the epidemiology, risk factors, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment of various skin diseases related to the *Malassezia* species.

Content: 1. Prevalence and pathogenicity of *Malassezia* fungi. 1.1. Distribution of *Malassezia* fungi. 1.2. Pathogenicity of *Malassezia* sp. 1.2.1. *Pityriasis versicolor* (PV). 1.2.2. *Malassezia folliculitis*. 1.2.3. *Seborrhoeic dermatitis/Dandruff* (SD/D). 1.2.4. Atopic dermatitis. 1.2.5. *Psoriasis*. 2. Drug susceptibility of *Malassezia* fungi. 3. Future of the research on *Malassezia* fungi

Słowa kluczowe: atopowe zapalenie skóry (AZS), grzybnice, lekowrażliwość, łupież pstry (PV), łuszczyca, *Malassezia* sp., zakażenia skóry
Key words: atopic dermatitis (AD), drug susceptibility, *Malassezia* sp., mycoses, pityriasis versicolor (PV), psoriasis, skin infections

1. Występowanie i chorobotwórczość grzybów z rodzaju *Malassezia*

1.1. Dystrybucja grzybów z rodzaju *Malassezia*

Grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą być izolowane z całej skóry ludzkiej. Miejsca, w których występują najczęściej to okolice bogate w gruczoły łojowe takie jak: okolica mostkowa, okolica międzyłopatkowa (tzw. rynny łojotokowe przednia i tylna), skóra owłosiona głowy, czoło, policzki oraz małżowiny uszne. Największe nasilenie kolonizacji *Malassezia* sp. obserwuje się po okresie dojrzewania u młodych dorosłych. Wraz z wiekiem, prawdopodobnie w związku ze zmniejszającą się aktywnością gruczołów łojowych i zawartością lipidów w skórze, spada częstość izolacji *Malassezia* sp. Pewne różnice w występowaniu tych grzybów na skórze zaobserwowano u kobiet i mężczyzn – u mężczyzn częściej izolowano je z dolnych części tułowia i górnych części ud w porównaniu z kobietami [13, 31].

Wyniki badań dotyczących kolonizacji skóry dziecięcej przez grzyby *Malassezia* sp. są bardzo rozbieżne. Różnice w ocenie częstości występowania tych grzybów u dzieci wydają się wynikać głównie z zastosowanej metody badawczej. A b r a h a m i wsp. w badaniu

przeprowadzonym w 1987 roku w grupie 60 zdrowych dzieci w wieku od 2 miesięcy do 14 lat nie stwierdzili kolonizacji skóry dzieci przez szczepy *Malassezia* sp. [1]. Odkrycie nowych gatunków grzybów z rodzaju *Malassezia* i zastosowanie metod molekularnych w ocenie ich występowania znacznie zwiększyło czułość metod badawczych, stąd w badaniach przeprowadzonych w kolejnych latach szczepy *Malassezia* sp. izolowano ze skóry nawet u 98% badanych dzieci [5, 10, 12]. Częstość kolonizacji skóry przez *Malassezia* sp. u zdrowych dzieci wzrasta wraz z wiekiem. Opisywane przypadki funge-mii wywołanej przez *Malassezia* sp. u cewnikowanych wcześniaków spowodowały wzrost badań dotyczących częstości występowania tych grzybów u noworodków. Szczepy *Malassezia* sp. izolowano ze skóry 34–100% hospitalizowanych noworodków, w zależności od cyto-wanego badania. Do czynników ułatwiających koloni-zację należały: wcześniactwo, niska masa urodzeniowa oraz wydłużający się okres hospitalizacji i żywienia pozajelitowego [30, 40, 62].

Badania dotyczące dystrybucji grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze ludzkiej opisują głównie występowanie poszczególnych gatunków *Malassezia*. W okolicy międzyłopatkowej stwierdzono głównie gatunki *M. globosa* i *M. sympodialis*, na skórze klatki piersiowej

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: +48 (0) 22 55-41-312; fax: +48 (0) 22 55-41-402; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

† Autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy

– *M. globosa*, *M. sympodialis* oraz *M. restricta*. Skórę owłosioną głowy kolonizuje najwięcej różnych gatunków: *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. restricta* oraz *M. slo-offiae* i *M. furfur*, natomiast na twarzy i przedramionach najczęściej stwierdza się obecność *M. globosa*, *M. sympodialis* i *M. furfur*. Również szczepy typowo zoofilne *M. pachydermatis* okazjonalnie są izolowane od ludzi, choć nie uznaje się ich za składnik normalnej ludzkiej flory [13, 31].

W wielu badaniach klinicznych próbowano wyodrębnić poszczególne gatunki *Malassezia* związane z różnymi chorobami dermatologicznymi. Wyniki tych badań nie przyniosły jednak konsensusu [3, 13, 31].



1.2. Chorobotwórczość grzybów *Malassezia* sp.

Grzyby z rodzaju *Malassezia* związane są z występowaniem wielu schorzeń dermatologicznych zarówno jako czynnik etiologiczny infekcji grzybiczej, jak i patogen nasilający zmiany skórne powstałe na drodze różnych mechanizmów. Do pierwszej grupy zalicza się łupież pstry oraz zapalenie mieszków włosowych, w których zmiany skórne są bezpośrednio związane ze wzrostem grzyba, natomiast do drugiej: łojotokowe zapalenie skóry, atopowe zapalenie skóry oraz łuszczycę [58]. U pacjentów z immunosupresją lub w przypadku zaistnienia szczególnych okoliczności (żywienie pozajelitowe u wcześniaków) grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą być też przyczyną zakażeń ogólnoustrojowych [13, 31].

1.2.1. Łupież pstry (*Pityriasis versicolor*, PV)

Łupież pstry jest przewlekłą, powierzchowną grzybicą charakteryzującą się występowaniem okrągłych i owalnych plam ze złuszczeniem naskórka zlokalizowanych głównie na skórze tułowia, szyi i ramion, Rys. 1, 2. Zmiany skórne mogą być odbarwione, przebarwione, czasem nieznacznie zaczerwienione, a w zaawansowanych przypadkach wykazują tendencję do zlewania się. Rozpoznanie ułatwia żółtawo-żółta fluorescencja w świetle lampy Wooda, obserwowana w około 30% przypadków PV. Wyniki ostatnich badań sugerują, że jedynie *M. furfur*, spośród wszystkich odkrytych gatunków *Malassezia*, wytwarza związki indolowe, pochodne tryptofanu, odpowiedzialne za fluorescencję w lampie Wooda, stąd dodatni wynik badania fluorescencji jedynie w niewielkim odsetku pacjentów. Wspomniane związki indolowe (w grupie tej m.in. pityriarubiny, pityrialakton, malassezyna) wiąże się z patogenezą PV, w szczególności zaś z powstawaniem charakterystycznych zmian zabarwienia skóry. Na przykład malassezyna, reprezentująca nową klasę agonistów receptora węglowodorów arylowych (AhR) indukuje apoptozę



Rys. 1, 2. Łupież pstry

w ludzkich melanocytach, prowadząc do depigmentacji skóry [39]. Efekt depigmentujący przypisuje się również działaniu kwasu azelainowego (C9 kwas dwukarboksyłowy), który, jak wykazano, odpowiada za inhibicję kompetencyjną tyrozynazy, kluczowego enzymu w procesie melanogenezy [52].

W bezpośrednim badaniu mikroskopowym uwiadcniają się zarodniki i strzępki *Malassezia* sp. Obecnie postuluje się, że do rozwoju PV dochodzi w chwili, gdy postać drożdżowa *Malassezia* sp. przechodzi w postać mycelialną zajmującą warstwę rogową naskórka. Stąd w badaniu mikroskopowym materiałów pobranych ze zmian skórnych w PV widoczne są właśnie strzępki

grzybni. Choroba ma charakter nawrotowy. Większość pacjentów z PV nie zgłasza dolegliwości subiektywnych, rzadko zmianom skórny może towarzyszyć świąd [31].

Łupież pstry występuje u ludzi na całym świecie. Częściej spotykany jest na obszarach charakteryzujących się wysoką temperaturą i dużą wilgotnością powietrza (choruje tam nawet do 40% populacji). W klimacie umiarkowanym występuje rzadziej; w Szwecji dotyka 1,1% ludności, a we Włoszech – 3,7%. Dermatоза ta dotyczy głównie młodych osób dorosłych po okresie dojrzewania, u których aktywność gruczołów łojowych jest największa. Opisywano również pojedyncze przypadki PV u dzieci i noworodków [31]. Do czynników endogennych zwiększających ryzyko PV należą: niedożywienie [53], stosowanie doustnej hormonalnej antykoncepcji [14], systemowe stosowanie glikokortykosteroidów i leków immunosupresyjnych oraz zwiększona podatność [17, 21].

Ze skóry pacjentów z PV najczęściej izolowano szczepy *M. globosa* [20, 45] i *M. sympodialis* [32, 33], rzadziej szczepy *M. slooffiae* i *M. furfur*. Różnice w częstości izolowanych gatunków mogą wynikać z warunkowań geograficznych, konieczne są jednak dalsze badania, aby potwierdzić tę hipotezę [31].

1.2.2. Zapalenie mieszków włosowych (*Malassezia folliculitis*)

Podobnie jak w łupieżu pстрыm, w przebiegu zapalenia mieszków włosowych zmiany skórne związane są bezpośrednio ze wzrostem grzybów *Malassezia* sp. w tkance skórnej. Zajęcie struktur mieszków włosowych przez drożdżową postać *Malassezia* sp. skutkuje powstaniem rumieniowych grudek i krost głównie na skórze tułowia i proksymalnych części ramion. W rejonach geograficznych o gorącym i wilgotnym klimacie choroba może mieć duże nasilenie i przebiegać z zajęciem twarzy. Zmianom skórny może towarzyszyć świąd. Obok komórek *Malassezia* sp., niektórzy badacze stwierdzali w obrębie mieszków włosowych również gronkowce oraz *Propionibacterium acne*, jednak w bezpośrednim badaniu mikroskopowym najczęściej obserwowano jedynie *Malassezia* sp. [31].

Do czynników predysponujących do wystąpienia *Malassezia folliculitis* zalicza się immunosupresję, cukrzycę oraz stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum. W badaniach przeprowadzonych w grupie pacjentów z eozynofilowym zapaleniem mieszków włosowych w przebiegu zakażenia HIV i AIDS zaobserwowano również wysoki odsetek kolonizacji mieszków włosowych przez grzyby *Malassezia* sp. [25, 26].

W piśmiennictwie brak jest badań dotyczących występowania poszczególnych gatunków *Malassezia* u pacjentów z *Malassezia folliculitis* [31].

1.2.3. Łojotokowe zapalenie skóry i łupież (*Seborrhoeic dermatitis/Dandruff; SD/D*)

Łojotokowe zapalenie skóry jest powszechnie występującą dermatozą. Szacuje się, że choroba dotyczy 1–3% populacji ogólnej, a w grupie osób młodych choruje na nią nawet do 5% populacji [41, 51]. Częstość występowania SD/D jest znacznie wyższa u pacjentów z immunosupresją, szczególnie z AIDS (30–33% pacjentów) [24, 26]. Choroba ma charakterystyczny obraz kliniczny. Najczęściej rozpoczyna się w okresie dojrzewania, a zmiany o największym nasileniu obserwuje się u młodych osób dorosłych. Ogniska rumieniowe pokryte tłustymi łuskami występują na owłosionej skórze głowy, w fałdach nosowo-wargowych, na policzkach, powiekach, w obrębie brwi, rzadziej zajmują małżowiny uszne, skórę klatki piersiowej i okolice międzyłopatkową. W przypadkach o dużym nasileniu może dojść do zajęcia skóry całego ciała. Choroba ma przewlekły przebieg z okresowymi zaostrzeniami, głównie w porze jesienno-zimowej. Wielu badaczy uważa, że łupież tłusty głowy to łagodna odmiana łojotokowego zapalenia skóry. Rola grzybów z rodzaju *Malassezia* w rozwoju SD/D jest badana od wielu lat. Już w 1975 roku McGeer i wsp. zaobserwowali większą kolonizację skóry przez *Malassezia* sp. u pacjentów z SD/D w porównaniu z osobami zdrowymi [44]. W wielu badaniach wykazano dodatnią korelację pomiędzy stopniem kolonizacji skóry przez grzyby *Malassezia* sp. i nasileniem objawów klinicznych w przebiegu SD/D [46] oraz znaczną poprawę stanu klinicznego po zastosowaniu leków przeciwgrzybiczych u pacjentów z SD/D. Obecnie sugeruje się, że zmiany w przebiegu SD/D są związane nie tyle z nadmierną kolonizacją skóry przez grzyby *Malassezia* sp., ile z nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną komórek gospodarza na obecność komórek grzyba [11].

Podobnie jak w przypadku PV, prowadzone obecnie badania dotyczą głównie występowania poszczególnych gatunków *Malassezia* u pacjentów z SD/D. Wyniki niektórych badań są bardzo rozbieżne, jednak z dostępnych obecnie danych wydaje się, że gatunki najbardziej związane z SD/D to *M. globosa* i *M. restricta*. Rzadziej izolowano ze zmian skórnych szczepy *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa* i *M. slooffiae* [3, 31].

1.2.4. Atopowe zapalenie skóry

Atopowe zapalenie skóry (*atopic dermatitis*, AD, AZS) jest przewlekłą, zapalną dermatozą świądową dotyczącą głównie wieku dziecięcego. AZS może przebiegać jako izolowane schorzenie lub stanowić manifestację ogólnoustrojowych zaburzeń o podłożu alergicznym wraz z zapaleniem błony śluzowej nosa i spojówek, astmą oskrzelową czy alergiami pokarmowymi. Częstość

Odkrycia potwierdzające udział *Malassezia* sp. w patogenezie AZS

Wnioski z badań klinicznych	Piśmiennictwo
1. Leczenie przeciwgrzybicze przyczynia się do poprawy klinicznej u pacjentów z AZS, ze zmianami na skórze głowy i szyi.	Clemmensen i Hjorth, 1983 [19]
2. Zwiększona częstość występowania nadwrażliwości typu I na antygeny <i>Malassezia</i> sp. u pacjentów z AZS.	Young i wsp., 1989 [64]
3. Pacjenci z AZS mają dodatnie testy płatkowe z ekstraktem <i>Malassezia</i> sp.	Rokugo i wsp., 1990 [49]
4. Leczenie przeciwgrzybicze przyczynia się do poprawy klinicznej u pacjentów z AZS, ze zmianami na skórze całego ciała.	Back i wsp., 1995 [6]
5. Pacjenci z AZS, ze zmianami na skórze głowy i szyi mają znacząco częściej IgE swoiste dla <i>Malassezia</i> sp. w porównaniu z IgE swoistymi dla antygenów innych grzybów.	Lindgren i wsp., 1995 [41]
6. Pacjenci z AZS mają limfocyty Th2 swoiste dla antygenów <i>Malassezia</i> sp.	Tengvall Linder i wsp., 1996 [57]
7. W surowicy pacjentów z AZS występują IgE swoiste dla antygenów różnych gatunków <i>Malassezia</i> sp.	Zargari i wsp., 2003 [65]

występowania AZS znacząco wzrosła w ostatnich dekadach. Obecnie szacuje się, że AZS dotyczy około 10–20% populacji pediatrycznej. U ponad połowy pacjentów pierwsze objawy choroby występują w okresie niemowlęcym, a u 90% przed ukończeniem 5. r.ż. Wśród osób dorosłych AZS obserwuje się u 1–3% populacji [38, 61]. Przyczyny powstania AZS są nadal niejasne. Klasykne badania genetyczne wykazały związek pomiędzy AZS i innymi chorobami atopowymi. Odsetek chorych z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku atopii wynosi 60–70%. Badania kliniczne w grupie bliźniąt dowiodły, że w przypadku bliźniąt jednojajowych zgodność zachorowania na AZS jest znacząco wyższa niż u dwujajowych (85% *versus* 30%). Istotną rolę czynników genetycznych potwierdzają również obserwacje rodzinne – stwierdzono, że ryzyko wystąpienia AZS u dziecka w przypadku, gdy oboje rodzice są chorzy wynosi 60–80%. Obecnie uważa się, że AZS jest dziedziczone wielogenowo, stwierdzono również występowanie zjawiska piętnowania genetycznego, gdzie wpływ genów matczyńskich przewyższa wpływ genów ojcowskich. W 2006 roku odkryto, że mutacja w obrębie genu filagryny, jednego z białek odpowiadających za tworzenie bariery naskórkowej, znacząco zwiększa ryzyko zachorowania na AZS, zwłaszcza na postać o wczesnym początku i trwałej nadwrażliwości. Odkrycie to potwierdza istotną rolę bariery skórnej, jako czynnika zapobiegającego odpowiedzi alergicznej. Obecnie uważa się, że jednym z głównych defektów u pacjentów z AZS jest upośledzone funkcjonowanie bariery skórnej, co prowadzi do nieprawidłowej, zwiększonej prezentacji antygenów komórkom układu immunologicznego [15].

Grzyby z rodzaju *Malassezia* wydają się stanowić istotny czynnik w patogenezie AZS u osób dorosłych, zwłaszcza ze zmianami skórnymi zlokalizowanymi na głowie i szyi. Już w latach 80. ub. w. zaobserwowano ustępowanie zmian skórných u pacjentów z AZS po zastosowaniu miejscowych i systemowych leków prze-

ciwgrzybiczych [19]. Istotne odkrycia potwierdzające udział grzybów *Malassezia* sp. w patogenezie AZS zestawiono w tabeli I. Częstość występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze dorosłych pacjentów z AZS oraz w populacji zdrowej jest podobna i wynosi między 50% a 80%, w zależności od zastosowanej metody badawczej. Natomiast w przypadku pacjentów z AZS znacząco częściej obserwuje się wysokie miana swoistych przeciwciał w klasie IgE przeciwko antygenom *Malassezia* sp. w surowicy oraz pozytywne wyniki punktowych i płatkowych testów skórnych z antygenami *Malassezia* sp. w porównaniu do grup kontrolnych [6, 41, 49, 51, 64]. Stąd, obecnie uważa się, że grzyby *Malassezia* sp. stanowią raczej czynnik alergizujący niż infekcyjny w przypadku pacjentów z AZS. Zwiększona wrażliwość na antygeny *Malassezia* sp. u pacjentów z AZS jest mediowana zarówno na drodze humoralnej jak i komórkowej. Odpowiedź komórkowa wydaje się być głównie typu Th2 [57]. W surowicy pacjentów z AZS stwierdzono znacząco wyższe poziomy IL4 i IL5 w porównaniu do grup kontrolnych [56]. Cytokiny te są związane z reakcjami immunologicznymi mediowanymi przez IgE i ich wysoki poziom może stymulować nadmierną produkcję IgE [63]. Jak dotąd nie stwierdzono korelacji pomiędzy objawami klinicznymi u pacjentów z AZS a poziomem swoistych przeciwciał IgE przeciwko antygenom *Malassezia* sp. w surowicy. Sugeruje się, że obecność swoistych przeciwciał IgE na mastocytach, poprzez uwalnianie histaminy nasila świąd skóry, który prowokuje drażnienie mechaniczne, doprowadzając w ten sposób do dalszego uszkodzenia bariery skórnej i zwiększonej ekspozycji na alergeny [3].

Przedmiotem licznych badań u pacjentów z AZS są również interakcje pomiędzy komórkami *Malassezia* sp. i komórkami dendrytycznymi w skórze. Autorzy badań sugerują, że dojrzałe komórki dendrytyczne prezentujące antygeny *Malassezia* sp. limfocytom T, odporne na lizę przez komórki NK, mogą przyczyniać się do

podtrzymania reakcji zapalnej w zmianach skórnych pacjentów z AZS, co dodatkowo jest jeszcze nasilane przez produkowane przez komórki dendrytyczne cytokiny prozapalne, takie jak: IL8, IL6 czy $IFN\gamma$ [16, 28]. Nasilenie zmian skórnych u pacjentów z AZS może nastąpić również na drodze aktywacji procesów zapalnych poprzez uwalnianie przez *Malassezia* sp. enzymy hydrolityczne [13, 31].

Liczne badania dotyczące występowania poszczególnych gatunków *Malassezia* u pacjentów z AZS nie przyniosły konsensusu. Ze zmian skórnych izolowano różne gatunki *Malassezia*, najczęściej: *M. globosa*, *M. restricta* [55], *M. sympodialis* [22, 33] i *M. furfur* [45].

1.2.5. Łuszczyca

Łuszczyca (*psoriasis*) jest jedną z najczęściej występujących przewlekłych zapalnych chorób skóry. Szacuje się, że około 1–5% populacji europejskiej choruje z powodu łuszczycy. Patogeneza łuszczycy nie jest do końca poznana. Istnieje wiele czynników predysponujących do wystąpienia choroby. Zalicza się do nich czynniki genetyczne (antygeny układu HLA: HLA-A2, -B13, -B17, -B27, -Bw57, -Cw2, -Cw6, DR7), immunologiczne oraz środowiskowe (uraz, światło, infekcje) [15, 37]. Zakażenia zarówno systemowe jak i miejscowe wywołane przez paciorkowce beta-hemolizujące, czy grzyby z rodzaju *Candida* stanowią znany czynnik inicjujący epizod łuszczycy wysiewnej czy zaostrzający przebieg łuszczycy plackowatej. W wielu badaniach wykazano, że stymulacja leukocytów jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z łuszczycą przez superantygeny paciorkowców grupy A wiązała się ze znacznie zwiększoną odpowiedzią proliferacyjną oraz uwalnianiem cytokin prozapalnych przez leukocyty [7].

Wiele badań klinicznych i przedklinicznych potwierdza udział grzybów z rodzaju *Malassezia* w rozwoju zmian łuszczykowych, zwłaszcza w przypadku łuszczycy owłosionej skóry głowy oraz okolicy narządów płciowych [43, 60]. Wysiew grudek łuszczykowych w miejscach aplikacji ekstraktów zawierających komórki *Malassezia* sp. obserwowano zarówno w przypadku ludzi jak i w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach [42, 50]. W badaniach klinicznych wykazano również zmniejszenie nasilenia łuszczycy po zastosowaniu doustnych i miejscowych leków przeciwgrzybiczych (bifonazol, ketokonazol) [2, 23]. Obecnie uważa się, że grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą zaostrzać przebieg łuszczycy poprzez uwalnianie cytokin prozapalnych, zwłaszcza interleukiny 8, dzięki aktywacji tzw. receptorów żetonowych (*Toll-like receptors*) typu II [8]. W następstwie inkubacji keratynocytów z grzybami z rodzaju *Malassezia* obserwowano również zwiększoną ekspresję TGF- β 1 oraz białek szoku cieplnego – HSP70 w keratynocytach

[9]. Do innych mechanizmów, mogących uczestniczyć w indukcji zmian skórnych należą: aktywacja układu dopełniacza, chemotaksja neutrofilów oraz zwiększona migracja innych komórek immunologicznych do skóry pod wpływem kolonizacji przez grzyby *Malassezia* sp. [3, 4, 31]. Wysoka aktywność enzymatyczna grzybów z rodzaju *Malassezia*, a w szczególności produkcja lipaz może stanowić mechanizm spustowy inicjujący proces zapalny w skórze pod wpływem aktywacji kaskady kwasu arachidonowego. Do innych istotnych w aktywacji stanu zapalnego enzymów produkowanych przez *Malassezia* sp. należą lipooksygenaza oraz lipoperoksydaza. Utlenianie wolnych i zestryfikowanych kwasów tłuszczowych błon komórkowych przez wymienione enzymy powoduje uszkodzenie komórek i rozwój procesu zapalnego [3, 4, 31].

Częstość kolonizacji skóry przez grzyby *Malassezia* sp. u pacjentów z łuszczycą waha się między 50–90%. Najczęściej izolowanym gatunkiem jest *M. globosa*, rzadziej izoluje się szczepy *M. slooffiae* i *M. restricta* [33, 47].

2. Wrażliwość na leki grzybów z rodzaju *Malassezia*

W leczeniu zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju *Malassezia* najczęściej wykorzystywane są pochodne imidazolowe (ketokonazol, mikonazol, ekonazol), triazole (flukonazol, itrakonazol) oraz cyklopiroksolamina. Azole (pochodne imidazolowe oraz triazole) stanowią obecnie największą grupę chemioterapeutyków przeciwgrzybiczych. Główny mechanizm działania tej grupy leków polega na blokowaniu syntezy ergosterolu, koniecznego do budowy ściany komórkowej grzyba poprzez hamowanie demetylacji węgla C14 w cząsteczce lanosterolu, prekursora ergosterolu. Azole wiążą się z cytochromem P-450, wypierając z wiązania tlen, co hamuje proces demetylacji C14 [29, 34, 35]. Azole są obecnie szeroko stosowane w leczeniu zarówno grzybic powierzchownych jak i systemowych.

Innym chemioterapeutykiem przeznaczonym do stosowania miejscowego jest cyklopiroksolamina. Jest to hydroksylowa pochodna pirydynonu o szerokim działaniu przeciwgrzybiczym (grzybobójcze i grzybostatyczne w odniesieniu do licznych gatunków grzybów chorobotwórczych), przeciwbakteryjnym i przeciwzapalnym. Mechanizm działania przeciwgrzybiczego leku polega na chelatowaniu jonów żelaza i glinu (Fe^{3+} i Al^{3+}), co zmniejsza aktywność enzymów metalowrażliwych, głównie cytochromów, katalaz i peroksydaz i w następstwie prowadzi do utrudnienia transportu jonów przez błony cytoplazmatyczne drobnoustrojów oraz dezorganizacji ich struktur wewnątrzkomórkowych. Cyklopiroksolamina hamuje również cykl komórkowy w fazie G1/S. Przeciwzapalne działanie cyklopiroksolaminy polega na blokowaniu syntezy prostaglandyn (PGE_2)

i leukotrienów (LTB₄) w granulocytach wielojądrazystych (siła działania przeciwzapalnego cyklopiroksolaminy przewyższa siłę działania hydrokortyzonu). Oprócz efektu przeciwgrzybiczego i przeciwzapalnego cyklopiroksolamina wykazuje działanie przeciwbakteryjne zarówno względem bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym *Proteus* sp. i *Pseudomonas aeruginosa* [36].

Mechanizmy oporności na leki grzybów z rodzaju *Malassezia* nie zostały dotychczas dokładnie poznane. Jedynie Uchida i wsp., w pracy opublikowanej w 1994 roku opisali możliwe mechanizmy oporności *M. pachydermatis* na antybiotyki polienowe [59]. W dostępnym obecnie piśmiennictwie brak jest danych dotyczących mechanizmów oporności na leki przeciwgrzybicze z innych grup a także innych gatunków *Malassezia*. Wielu autorów opisywało natomiast mechanizmy lekooporności innych drożdży, np. grzybów z rodzaju *Candida*. Wydaje się, że mechanizmy te w przypadku grzybów z rodzaju *Malassezia* będą podobne [48].

Badania dotyczące oporności na leki przeciwgrzybicze z grupy pochodnych azolowych wykazały, że nabywanie oporności odbywa się stopniowo, najczęściej w wyniku ekspozycji na subterapeutyczne dawki leków. Autorzy badań sugerują, że wiele różnych mechanizmów równocześnie przyczynia się do powstania ostatecznego lekoopornego fenotypu, szczególnie w przypadku szczepów o wysokiej oporności na leki azolowe. W jednym z badań dotyczących oporności *C. albicans* wykazano, że aż w przypadku 75% badanych szczepów oporność na leki azolowe była uwarunkowana wieloczynnikowo [18]. Do możliwych opisywanych mechanizmów oporności należą:

- zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia leku, związane ze zwiększoną ekspresją genów dla wielolekowych transporterów błonowych (*upregulation multidrug efflux transporter genes*) [29],
- zmniejszenie powinowactwa do docelowego substratu: enzymu 14- α -demetylazy lanosterolu w następstwie mutacji kodującego go genu *ERG11* [27],
- zmiana składu steroli w błonie komórkowej grzyba i w następstwie zmniejszenie stężenia toksycznych związków powstałych w wyniku zahamowania aktywności 14- α -demetylazy lanosterolu [27],
- zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej grzyba dla leku w następstwie zmniejszenia stężenia ergosterolu oraz zmniejszenia stosunku fosfatydylocholine do fosfatydyloetanolaminy w błonie komórkowej [27],
- zwiększenie ekspresji genu dla 14- α -demetylazy lanosterolu [29].

Oporność grzybów z rodzaju *Malassezia* oraz innych drożdży i dermatofitów na cyklopiroks występuje niezmiernie rzadko pomimo częstego stosowania cyklopiroksolaminy w leczeniu grzybic powierzchniowych.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest badań opisujących możliwe mechanizmy oporności na cyklopiroksolaminę [54].

3. Przyszłość badań nad grzybami z rodzaju *Malassezia*

Zakażenia grzybami z rodzaju *Malassezia* są problemem klinicznym na całym świecie. Duże zróżnicowanie gatunków *Malassezia* pozwala przypuszczać, że prawdopodobnie istnieją także indywidualne różnice w patomechanizmie chorób wywoływanych przez poszczególne genotypy tych grzybów. W przebiegu infekcji grzybami z rodzaju *Malassezia* istotną rolę odgrywają również predyspozycje samego gospodarza.

W 2007 roku na kongresie w Turynie, międzynarodowa grupa badaczy określiła nadrzędne cele w dalszych badaniach nad *Malassezia* sp. Należą do nich:

- standaryzacja metod pobierania materiału do badań, hodowli i identyfikacji gatunkowej *Malassezia* sp., oceniania lekowrażliwości oraz potencjalnego ryzyka zakażenia szczepami zoofilnymi *M. pachydermatis*,
- stworzenie internetowej bazy szczepów referencyjnych,
- kontynuacja badań dotyczących epidemiologii zakażeń *Malassezia* sp., z uwzględnieniem identyfikacji gatunkowej grzybów oraz ocena występowania zakażeń mieszanych na skórze osób zdrowych i chorych,
- określenie czynników warunkujących swoistość dystrybucji szczepów *Malassezia* sp. w zależności od gatunku gospodarza zwierzęcego, a także czynników wpływających na indywidualne predyspozycje do zakażeń u ludzi i zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Abraham Z., Berderly A., Lefler E.: *Pityrosporum orbiculare* in children. *Mykosen*, **30**, 581–583 (1987)
2. Alford R.H., Vice C.G., Cartwright B.B., King L.E.: Ketoconazole's inhibition of fungal antigen-induced thymidine uptake by lymphocytes from patients with psoriasis. *Am. J. Med. Sci.* **291**, 75 (1986)
3. Ashbee H.R.: Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 14–23 (2006)
4. Ashbee H.R., Evans V.: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 21–57 (2002)
5. Ashbee H.R., Leck A.K., Puntis J.W., Parsons W.J., Evans E.G.: Skin colonization by *Malassezia* in neonates and infants. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**, 212–216 (2002)
6. Back O., Scheynius A., Johansson S.G.: Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 448–451 (1995)
7. Baker B.S., Bokth S., Powles A., Garioch J.J., Lewis H., Valdimarsson H., Fry L.: Group A streptococcal antigen – specific T lymphocytes in guttae psoriatics lesion. *Br. J. Dermatol.* **128**, 493–499 (1993)

8. Baroni A., Orlando M., Donnarumma G. i wsp.: Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signaling in human keratinocytes in response to *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* **297**, 280 (2006)
9. Baroni A., Paoletti I., Ruocco E., Agozzino M., Tufano M.A., Donnarumma G.: Possible role of *Malassezia furfur* in psoriasis: modulation of TGF-beta1, integrin, and HSP70 expression in human keratinocytes and in the skin of psoriasis-affected patients. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 35–42 (2004)
10. Bergbrant I.M., Broberg A.: *Pityrosporum ovale* culture from the forehead of healthy children. *Acta Dermatol. Venereol.* **74**, 260–261 (1994)
11. Bergbrant I.M., Faergemann J.: Seborrheic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a cultural and immunological study. *Acta Dermatol. Venereol.* **69**, 332–335 (1989)
12. Bernier V., Weill F.X., Hirigoyen V., Elleau C., Feyler A., Labrèze C., Sarlangue J., Chène G., Couprie B., Taïeb A.: Skin colonization by *Malassezia* species in neonates: a prospective study and relationship with neonatal cephalic pustulosis. *Arch. Dermatol.* **138**, 215–228 (2002)
13. Boekhout T., Guého-Kellermann E., Mayser P., Velegriki A. (red.). *Malassezia* and the Skin: Science and Clinical Practice, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, s. 1–319.
14. Borelli D., Jacobs P.H., Nall L.: Tinea versicolor: epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects. *J. Am. Acad. Dermatol.* **25**, 300–305 (1991)
15. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H., Burgdorf W.: Erythematopapulo-squamous diseases. [w:] *Dermatology*. Springer Verlag, Berlin, 2000, s. 585–608.
16. Buentke E., Heffler L.C., Wilson J.L., Wallin R.P., Löfman C., Chambers B.J., Ljunggren H.G., Scheynius A.: Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin – *Malassezia*-influenced cell interaction. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 850–857 (2002)
17. Burke R.C.: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infection in human beings. *J. Invest. Dermatol.* **36**, 389–402 (1961)
18. Canuto M.M., Rodero F.G.: Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 550–563 (2002)
19. Clemmensen O., Hjorth N.: Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type I sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*. *Sem. Dermatol.* **2**, 26–29 (1983)
20. Crespo E.V., Ojeda M.A., Vera C.A., Crespo E.A., Sanchez F.F.: *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br. J. Dermatol.* **143**, 799–803 (2000)
21. Faergemann J., Bernander S.: Tinea versicolor and *Pityrosporum orbiculare*: a mycological investigation. *Sabouraudia*, **17**, 171–179 (1979)
22. Faergemann J.: Atopic dermatitis and fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 545–563 (2002)
23. Farr P.M., Krause L.B., Marks J.M., Shuster S.: Response of scalp psoriasis to oral ketoconazole. *Lancet*, **2**, 921 (1985)
24. Farthing C.F., Staughton R.C., Rowland Payne C.M.: Skin disease in homosexual patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and lesser forms of human T cell leukaemia virus (HTLV III) disease. *Clin. Exp. Dermatol.* **10**, 3–12 (1985)
25. Fearfield L.A., Rowe A., Francis N., Bunker C.B., Staughton R.C.: Itchy folliculitis and human immunodeficiency virus infection: clinicopathological and immunological features, pathogenesis and treatment. *Br. J. Dermatol.* **141**, 3–11 (1999)
26. Ferrándiz C., Ribera M., Barranco J.C., Clotet B., Lorenzo J.C.: Eosinophilic pustular folliculitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Int. J. Dermatol.* **31**, 193–195 (1992)
27. Francois I.E.G.A., Aerts A.M., Commue B.P.A., Thevissen K.: Currently used antimycotics: spectrum, mode of action and resistance occurrence. *Current Drug Targets*, **6**, 895–907 (2005)
28. Gabrielsson S., Buentke E., Liedén A., Schmidt M., D'Amato M., Tengvall-Linder M., Scheynius A.: *Malassezia sympodialis* stimulation differently affects gene expression in dendritic cells from atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Acta Dermatol. Venerol.* **84**, 339–345 (2004)
29. Ghannoum M.A., Rice L.B.: Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 501–517 (1999)
30. Guého E., Simmons R.B., Pruitt W.R., Meyer S.A., Ahearn D.G.: Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1789–1790 (1987)
31. Gupta A.K., Batra R., Bluhm R., Boekhout T., Dawson T.L. Jr: Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J. Am. Acad. Dermatol.* **51**, 785–798 (2004)
32. Gupta A.K., Kohli Y., Faergemann J.: Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med. Mycol.* **39**, 199–206 (2001)
33. Gupta A.K., Kohli Y., Summerbell R.C., Faergemann J.: Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med. Mycol.* **39**, 243–251 (2001)
34. Hitchcock C., Whittle P.T.: Chemistry and mode of action of fluconazole. [w:] Rippon J.W., Fromtling R.A. (red.) *Cutaneous antifungal agents: selected compounds in clinical practice and development*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, s. 183–197.
35. Holt R.J.: The imidazoles. [w:] Speller DCE (red), *Antifungal chemotherapy*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 1980, s. 107–148.
36. <http://www.drugs.com/monograph/ciclopirox-olamine.html>
37. Jabłońska S., Majewski S.: *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005, s. 1–528.
38. Katsarou A., Armenaka M.C.: Atopic dermatitis in older patients: particular points. *JEADV*, **25**, 12–18 (2011)
39. Krämer, H.J., Podobinska M., Bartsch A., Battmann A., Thoma W., Bernd A., Kummer W., Irlinger B., Steglich W., Mayser P.: Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem*, **6**, 860–865 (2005)
40. Larocco M., Dorenbaum A., Robinson A., Pickering L.K.: Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and laboratory features. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 398–401 (1988)
41. Lindgren L., Wahlgren C.F., Johansson S.G., Wiklund I., Nordvall S.L.: Occurrence and clinical features of sensitization to *Pityrosporum orbiculare* and other allergens in children with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **75**, 300–304 (1995)
42. Lober C.W., Belew P.W., Rosenberg E.W., Bale G.: Patch test with killed sonicated microflora in patients with psoriasis. *Arch. Dermatol.* **118**, 322 (1982)
43. Mayser P., Schutz M., Schuppe H.C., Jung A., Schill W.B.: Frequency and spectrum of *Malassezia* yeasts in the area of prepuce and glans penis. *BJU Int.* **88**, 554–558 (2001)
44. McGinley K.J., Leyden J.J., Marples R.R., Kligman A.M.: Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff, and seborrheic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **64**, 401–405 (1975)
45. Nakabayashi A., Sei Y., Guillot J.: Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med. Mycol.* **38**, 337–341 (2000)

46. Pierard G.E., Arrese J.E., Pierard-Franchimont C., Doncker P.: Prolonged effects of antidandruff shampoos – time to recurrence of *Malassezia ovalis* colonization of skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **19**, 111–117 (1997)
47. Prohic A.: Identification of *Malassezia* species from scalp skin of patients with psoriasis and healthy subjects. *Acta Dermatol-venereol. Croat.* **11**, 10–16 (2003)
48. Robson D. Malassezia: Mechanisms of possible drug resistance. Australia College of Veterinary Scientists Dermatology Chapter Science Week Proceedings, Gold Coast, 6–7th July 2007, s. 63–67 (<http://dermatology.acvsc.org.au>).
49. Rokugo M., Tagami H., Usuba Y., Tomita Y.: Contact sensitivity to *Pityrosporum ovale* in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* **126**, 627–632 (1990)
50. Rosenberg E.W., Belew P.W., Bale G.: Effect of topical applications of heavy suspensions of killed *Malassezia ovalis* on rabbit skin. *Mycopathologia*, **72**, 147 (1980)
51. Savolainen J., Lintu P., Kosonen J., Kortekangas-Savolainen O., Viander M., Pène J., Kalimo K., Terho E.O., Bousquet J.: *Pityrosporum* and *Candida* specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin. Exp. Allergy*, **31**, 125–134 (2001)
52. Schallreuter K.U., Wood J.W.: A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Arch. Dermatol. Res.*, **282**, 168–171 (1990)
53. Stein D.H.: Superficial fungal infections. *Pediatr. Clin. North Am.* **30**, 545–561 (1983)
54. Subissi A., Monti D., Togni G., Mailland F.: Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs*, **70**, 2133–2152 (2010)
55. Sugita T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H., Shinoda T., Nishikawa A. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3486–90 (2001)
56. Tengvall Linder M., Johansson C., Bengtsson A., Holm L., Härfäst B., Scheynius A.: *Pityrosporum orbiculare*-reactive T-cell lines in atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Scand. J. Immunol.* **47**, 152–158 (1998)
57. Tengvall Linder M., Johansson C., Zargari A., Bengtsson A., van der Ploeg I., Jones I., Harfäst B., Scheynius A.: Detection of *Pityrosporum orbiculare* reactive T cells from skin and blood in atopic dermatitis and characterization of their cytokine profiles. *Clin. Exp. Allergy*, **26**, 1286–1297 (1996)
58. Terui T., Kudo K., Tagami H.: Cutaneous immune and inflammatory reactions to *Malassezia furfur*. *Nippon Ishinkin Gakkai*, **40**, 63–71 (1999)
59. Uchida Y., Onodera S., Nakade T., Otomo K.: Sterol composition in polyene antibiotic – sensitive and resistant strains of *Malassezia pachydermatis*. *Vet. Res. Commun.* **18**, 183–187 (1994)
60. Van de Kerkhof P.C., Franssen M.E.: Psoriasis of the scalp: diagnosis and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 159–165 (2001)
61. Wanat-Krzak M., Kurzawa R.: Atopowe zapalenie skóry – etiopatogeneza, diagnostyka i leczenie. *Alergologia i pulmonologia wieku dziecięcego. Klin. Pediatr.* **10**, 237–244 (2002)
62. Welbel S.F., McNeil M.M., Pramanik A., Silberman R., Oberle A.D., Midgley G., Crow S., Jarvis W.R.: Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**, 104–108 (1994)
63. Wollenberg A., Bieber T.: Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy*, **55**, 205–213 (2000)
64. Young E., Koers W.J., Berrens L.: Intracutaneous tests with pityrosporon extract in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **144**, 122–124 (1989)
65. Zargari A., Midgley G., Bäck O., Johansson S.G., Scheynius A.: IgE-reactivity to seven *Malassezia* species. *Allergy*, **58**, 306–311 (2003)

Patrycja Kobierecka¹, Agnieszka Wyszynska¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego, Zakład Genetyki Bakterii, ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka CDT – operon *cdt*. 3. Rola podjednostek toksyny. 4. Mechanizm składania dojrzałej toksyny, struktura CDT. 5. Losy CDT w komórkach docelowych. 6. Mechanizm intoksykacji komórki przez toksyny CDT. 7. Nietypowa toksyna CDT wytwarzana przez *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. 8. Podsumowanie

Characterization of CDT (cytolethal distending toxin) genotoxins

Abstract: The cytolethal distending toxins (CDTs) comprise a family of intracellularly acting bacterial protein genotoxins, produced by a variety of Gram-negative pathogenic bacteria, which cause DNA damage in the target cells. The DNA damage-response in the initiated cell results in the characteristic and irreversible cell cycle arrest and apoptosis in a broad range of mammalian cell cultures. Most of CDTs are AB₂ toxins composed of three different subunits: CdtA and CdtC, both exhibiting a lectin-type fold, and CdtB, which is the active component of the complex, with DNase I and phosphatase activity. Although it is generally accepted that CdtA and CdtC, required for full activity of the CdtB, mediate its delivery into host cells, their precise role in the process remains poorly understood. Also the mechanism of toxin secretion and the mechanisms of cell surface binding, uptake and trafficking require further investigation. Some bacteria utilize OMVs to secrete CDTs. After internalization by dynamin-dependent endocytosis which requires the intact lipid rafts, toxin is retrograde transported through Golgi complex and the endoplasmic reticulum into the cell nuclear compartment, where CdtB exerts its toxic activity. CDTs are virulence determinants playing an important role in the pathogenesis of several bacterial diseases associated, for example, with human infections by *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

This review encompasses recent work on CDTs and focuses on the CDTs structure as well as on the molecular mechanisms of toxin uptake and cell's intoxication. We also discuss some controversial issues and indicate questions which still remain unanswered.

Contents: 1. Introduction. 2. General characterization of CDT – *cdt* operon. 3. Role of CDT toxin subunits. 4. Mechanisms of mature toxin assembly, CDT tertiary structure. 5. CDT uptake into host cells. 6. Mechanism of CDT cellular intoxication. 7. Unusual CDT toxin producing by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. 8. Summary

Słowa kluczowe: genotoksyna, CDT, aktywność DNazy, aktywność fosfatazy, apoptoza
Key words: genotoxin, CDT, DNase activity, phosphatase activity, apoptosis

1. Wstęp

Patogenne mikroorganizmy podczas koewolucji z organizmem gospodarza wykształciły różnorodne strategie inwazji i przeżycia. Jednym z tych mechanizmów jest wydzielanie związków, głównie białek zwanych egzotoksynami, które modyfikują funkcje komórkowe. Najczęściej ich aktywność jest letalna dla komórek gospodarza. Egzotoksyny wytwarzane są zarówno przez bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne, zarówno przez bakterie tlenowe jak i beztlenowe. Różnią się one mechanizmami działania oraz docelowymi komórkami wobec których ujawniają swoją aktywność, a ich nomenklatura nie jest jednoznacznie usystematyzowana. Nazwy mogą pochodzić od rodzaju atakowanych komórek (neurotoksyny, leukotoksyny), od szczepów, przez które są produkowane (*Shigella* sp. – toksyna Shiga), wywołanych chorób (*Clostridium tetani* – toksyna tężca) czy też posiadanej aktywności (*Bordetella pertussis* – cyklaza adenyloza). Zdarza się, że nadawane jest im mało informacyjne oznaczenie literowe, tak jak w przypadku

toksyny A wydzielanej przez *Pseudomonas aeruginosa*. Niektóre toksyny posiadają kilka wymiennie stosowanych nazw i tak np. toksyna *E. coli* podobna do toksyny czerwonki zwana jest też werotoksyną, od nazwy linii małych komórek (Vero) wrażliwych na jej działanie. Egzotoksyny wydzielane są przez błonę zewnętrzną bakterii gramujemnych za pomocą różnych systemów sekrecji (I, II, V, OMVs – *outer membrane vesicles*) [13, 33]. Do grupy toksyn zaliczane są także przez niektórych badaczy tzw. białka efektorowe przekazywane z cytozolu bakterii do docelowej komórki za pomocą systemu sekrecji typu III (TTSS – *type three secretion system*) lub IV (TFSS – *type four secretion system*). Białka te modyfikują procesy fizjologiczne komórek eukariotycznych, tak by stworzyć dogodny dla mikroorganizmu warunki do życia i replikacji [12, 70].

Przyjmując za kryterium podziału egzotoksyn mechanizm ich działania można wyróżnić trzy główne ich typy: a) toksyny internalizowane przez komórki gospodarza i wpływające na ich strukturę/metabolizm, b) toksyny oddziałujące z receptorami na powierzchni

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

komórek ssaczyh i wywołujące wielopoziomową odpowiedź tzw. superantygeny oraz c) toksyny uszkodzające błonę cytoplazmatyczną, poprzez tworzenie w niej porów lub aktywność enzymatyczną [65].

Przedstawiony niżej artykuł przeglądowy ma na celu zapoznanie czytelnika z danymi eksperymentalnymi opisującymi strukturę oraz mechanizm działania toksyny CDT (*cytolethal distending toxin*). Jest to pierwsza opisana genotoksyna, która wywołuje uszkodzenie materiału genetycznego wrażliwych komórek eukariotycznych, co skutkuje zatrzymaniem ich cyklu komórkowego i w efekcie śmierć komórek. Z tego powodu zwana jest także cyklomoduliną. Toksyna CDT jest produkowana przez wiele gatunków Gram-ujemnych bakterii patogennych dla ludzi i/lub zwierząt, kolonizujących różne nisze ekologiczne, należących do klas Gamma i Epsilonproteobacteria. Aktualnie w bazach danych znajduje się ponad 500 sekwencji aminokwasowych białek adnotowanych jako sekwencje aminokwasowe odpowiednich podjednostek toksyn CDT [21]. Najdokładniej pod względem biochemicznym, strukturalnym oraz fizjologicznym przebadane zostały toksyny CDT produkowane przez: *Escherichia coli* (EcCDT), *Haemophilus ducreyi* (HdCDT), *Shigella dysenteriae* (SdCDT), *Salmonella enterica* sv. Typhi (SeCDT), *Helicobacter hepaticus* (HhCDT), *Aggregatibacter* (dawniej *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (AaCDT) i *Campylobacter* spp (CjCDT) [3, 14, 23, 25, 40, 53, 64].

Najczęściej zalecana nomenklatura toksyn CDT produkowanych przez różne gatunki mikroorganizmów, podana wyżej, zakłada poprzedzenie skrótu CDT dużą literą odpowiadającą pierwszej literze nazwy rodzajowej i małą literą odpowiadającą pierwszej literze nazwy gatunkowej produkującego toksynę mikroorganizmu. Wraz z szybkim wzrostem liczby mikroorganizmów o zsekwencjonowanych genomach ten system już niedługo może okazać się niejednoznaczny. Ostatnio zaproponowano więc zastąpienie jednej litery nazwy gatunkowej jej trzema pierwszymi literami. I tak zamiast CjCDT niektórzy autorzy proponują stosowanie oznaczenia CjejCDT [30].

2. Ogólna charakterystyka CDT – operon *cdt*

Toksyna CDT została po raz pierwszy opisana w 1987 roku, kiedy to Johnson i Lior wykazali, że supernatant z hodowli komórek *E. coli* powoduje charakterystyczne postępujące, powolne pęcznienie komórek eukariotycznych (2–5 dni) prowadząc ostatecznie do ich śmierci [7, 32]. W 1988 roku udokumentowano, że niektóre kliniczne izolaty *C. jejuni* powodują podobne zmiany [7, 31]. Wrażliwa na działanie temperatury i trypsyny toksyna wykazuje cytotoxyczność w stosunku do komórek większości linii komórkowych,

m.in. CHO (*chinese hamster ovary*), HeLa (*human cervical adenocarcinoma epithelial cells*) [15] i Hep-2 (*human epithelial type 2*) [51]. Na jej działanie nie są natomiast wrażliwe fibroblasty 3T3 (*mouse embryonic fibroblasts cell line*) [8], jak również komórki linii Caco-2 (*human colonic carcinoma cell line*) [15] i ludzkie limfocyty [62].

Locus CDT składa się z trzech zlokalizowanych przeważnie na chromosomie, wspólnie, konstytutywnie transkrybowanych otwartych ramek odczytu (ORF): *cdtA*, *cdtB* i *cdtC* [40, 51, 68]. Unikalny locus *cdt*, składający się z pięciu ORFs: *orf1*, *orf2*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, występuje w genomie *A. actinomycetemcomitans*. Dwie krótkie otwarte ramki odczytu (*orf1* i *orf2*) zlokalizowane są powyżej genu *cdtA* i prawdopodobnie transkrybowane razem z trzema genami *cdt*. Nie wiadomo jednak czy mRNA *orf1* i *orf2* ulegają translacji *in vivo*, a delecja tego fragmentu DNA nie wpływa na aktywność toksyny [61]. Patogenne szczepy *E. coli* nietypowo wytwarzają pięć typów toksyn CDT (oznaczane EcCDT I–V zgodnie z chronologią ich opisanie), z których jedynie EcCDT-III kodowana jest przez geny zlokalizowane na plazmidzie Vir [1, 52, 68, 69]. Chromosomowe geny kodujące pozostałe typy toksyn *E. coli* otoczone są przez nukleotydowe sekwencje lambdoidalnych fagów wskazujące na ich przeniesienie na drodze transdukcji, co sugeruje, że operon *cdt* został nabyty na drodze horyzontalnego transferu genów i stanowi wyspę patogenności niedużych rozmiarów [37]. Z trzech genów, których produkty tworzą toksynę CDT, najwyższy poziom konserwacji wykazuje sekwencja nukleotydowa genu *cdtB* [71]. Poziom identyczności sekwencji aminokwasowych CdtB zależy od porównywanych gatunków bakterii. Tak np. sekwencja aminokwasowa HdCdtB jest identyczna w 95,8% z AaCdtB, podczas gdy z EcCdtB-I wykazuje jedynie 51,1% identyczności [7, 62]. Niezależnie jednak od stopnia identyczności sekwencji aminokwasowych podjednostek CdtB zachowują one elementy strukturalne warunkujące podobny mechanizm ich działania.

CDT należy do grupy toksyn AB, które wnikając do wnętrza komórek gospodarza modulują w różnorodny sposób ich strukturę i/lub metabolizm. Generalnie toksyny AB składają się z podjednostki A (activity) posiadającej aktywność enzymatyczną i z podjednostki/ek B (*binding*), które poprzez wiązanie się do swoistych receptorów na powierzchni komórki docelowej pośredniczy/ą w transporcie podjednostki A do miejsca działania. Wyróżnianych jest kilka podklas toksyn AB w zależności od budowy i mechanizmu składania dojrzałej toksyny. Toksyna A *P. aeruginosa* lub toksyna dyfterytu składają się z jednej podjednostki A i jednej podjednostki B syntetyzowanych jako pojedynczy łańcuch białkowy, który przechodzi następnie potranslacyjne modyfikacje. Toksyna cholery oraz toksyna LT enterotoksycznych szczepów *E. coli* to przykłady toksyn podklasy AB₅. Toksyna wąglika należy do trzeciej

podklasy, ponieważ jej podjednostki transportowane są niezależnie na zewnątrz komórki bakteryjnej i składane do dojrzałej holotoksyny dopiero na powierzchni komórki eukariotycznej. CDT należy do nowej podklasy toksyn AB – podtyp AB₂. Spośród trzech budujących ją podjednostek: CdtA, CdtB i CdtC aktywność enzymatyczną posiada CdtB, natomiast CdtA i CdtC odpowiadają raczej za rozpoznanie docelowej komórki i pośredniczą w transporcie podjednostki B do jej wnętrza, choć ich dokładna rola w procesie intoksykacji komórek docelowych nie jest do końca wyjaśniona. Masy cząsteczkowe poszczególnych podjednostek w zależności od gatunku wytwarzającego je mikroorganizmu wynoszą odpowiednio: 23–30, 28–29, i 19–21 kDa dla CdtA, CdtB i CdtC [27; 58; 61]. Trzy podjednostki toksyny są syntetyzowane konstytutywnie, składane w kompleks na terenie peryplazmy po usunięciu sekwencji sygnałnych i translokowane na zewnątrz komórki bakteryjnej. Przypisanie funkcji określonej podjednostce możliwe było dopiero po sklonowaniu kodujących je genów w komórkach *E. coli* i oczyszczeniu rekombinowanych białek. Wcześniej uzyskiwano niespójne wyniki badań, co prawdopodobnie było wynikiem zanieczyszczenia preparatu badanej podjednostki pozostałymi składnikami kompleksu. Ostatnio uzyskane dane eksperymentalne sugerują, że obecność trzech podjednostek jest konieczna dla zachowania pełnej aktywności przez toksynę CDT wydzielaną przez *H. ducrei*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* oraz *Camylobacter jejuni* [5, 36, 46, 47, 54, 55, 58, 71], choć kontrowersje nadal dotyczą roli podjednostki CdtA. Jej obecność w kompleksie nie wydaje się być absolutnie wymagana, choć podwyższa poziom indukowanych zmian w komórkach eukariotycznych [4, 5, 38]. Nietypową strukturę posiada toksyna CDT produkowana przez komórki *Salmonella enterica* sv. Typhi, co opisano w dalszej części tej pracy przeglądowej.

3. Funkcje podjednostek toksyny

Podjednostka CdtB wykazuje strukturalne podobieństwo do nukleaz eukariotycznych. Charakterystyczne dla ssaczej DNazy I reszty aminokwasowe zaangażowane w hydrolizę wiązań fosfodiesterowych (His134 i His252), reszty aminokwasowe biorące udział w tworzeniu wiązań wodorowych (Glu78 i Asp212), jak również wysoko konserwowane reszty aminokwasowe oddziałujące z DNA (Arg111, Asn170, Arg41) mają swoje odpowiedniki w sekwencji aminokwasowej CdtB. Podjednostka CdtB zawiera także odnajdywany we wszystkich DNazach pentapeptydowy motyw (Ser-Asp-His-Tyr-Pro), w którym dwie reszty aminokwasowe (Asp251 i His252) są kluczowe w przebiegu procesu enzymatycznego [15, 51]. Przewidywaną na podstawie analizy *in silico*

funkcję nukleolityczną potwierdzono doświadczalnie. Stwierdzono, że preparat zawierające EcCDT, AaCDT bądź HdCDT w warunkach *in vitro*, wykazuje aktywność DNazy wobec plazmidowego DNA [5, 14, 15, 48]. Także wprowadzenie oczyszczonej podjednostki CdtB na drodze elektroporacji lub bezpośredniej iniekcji do komórek eukariotycznych stymuluje zmiany w chromatynie transfekowanych komórek [18, 36]. Zmiana aminokwasów uwikłanych w proces katalityczny bądź wiązanie Mg²⁺ wykazała, że zmutowane białka nie posiadają aktywności nukleazy w warunkach *in vitro* i nie wywołują w komórkach typowych dla działania opisywanej toksyny zmian [15, 24, 26, 35].

CdtB, w zależności od pochodzenia, może wykazywać różny poziom aktywności nukleolitycznej. E l w e l l i D r e y f u s za pomocą reakcji „nacinania plazmidowego DNA”, umożliwiającej ilościowe oszacowanie superzwiniętej (*supercoiled*) formy DNA, udokumentowali, że EcCdtII-B posiada tylko 0,01% aktywności ludzkiej lub bydłowej DNazy I [14]. Jednocześnie wykazano, że zagęszczony supernatant znad komórek *E. coli* zawierających HdCdtB wykazuje aktywność na poziomie podobnym do trzustkowej DNazy I [20]. Niska nukleazowa aktywność CdtB obserwowana *in vitro* może sugerować, że białko to wymaga do osiągnięcia pełnej aktywności obecności komórkowego kofaktora lub specyficznej struktury chromatyny. Jednakże wiadomo, że jedno dwuniciowe pęknięcie nici DNA jest wystarczające do zatrzymania cyklu komórkowego. Możliwe jest zatem, że nawet niska aktywność nukleazy *in vivo* jest wystarczająca do wywołania efektu cytotoksycznego [37].

Kontrowersyjne wnioski z przeprowadzonych eksperymentów wysunuli S h e n k e r i wsp, którzy sugerują, że zmiany wywołane przez CDT związane są raczej z aktywnością fosfatazową białka [60]. Wykazali oni, że podjednostka AaCdtB oprócz aktywności nukleolitycznej przeprowadza hydrolizę 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PI-3-4-5-P3; PIP3) do 3,4-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PI-3,4-P2). Porównanie sekwencji aminokwasowych AaCdtB, i 5-fosfatazy inozytolopoli-fosfatydylowej pozwoliło wskazać konserwowane regiony odpowiedzialne za aktywność fosfatazową białka. W celu dokładniejszego zbadania powiązań pomiędzy strukturą i funkcją białka stworzono kilka punktowych mutantów CdtB, w których zmieniono aminokwasy pełniące funkcje katalityczne (CdtB H160Q, CdtB H274Q, CdtB D199S, CdtB R117A). We wszystkich przypadkach zaobserwowano zredukowaną aktywność fosfatazy w porównaniu do aktywności CdtB dzikiego typu. Zmutowane białka wykazywały również obniżoną aktywność DNazy I, choć w przypadku CdtB H274Q aktywność nukleazowa nie uległa zmianie. Według autorów głównym celem działania CdtB jest PI-3,4,5-P3. Badania S h e n k e r a i wsp. nie wykluczają jednak możliwości, że CdtB pełni podwójną funkcję. Aktywność DNazy

warunkuje toksyczność CdtB w niektórych typach komórek, podczas gdy aktywność fosfatazy istotna jest dla oddziaływania z innymi rodzajami komórek [60]. Podobne doświadczenie wykonali Rabin i wsp. również udowadniając, że CdtB posiada dwie aktywności, DNazy i fosfatazy PIP3, oraz, że aktywności te można od siebie odróżnić stosując mutacje specyficzne co do miejsca [53]. AaCdtB, do której sekwencji aminokwasowej wprowadzono specyficzne wobec miejsca mutacje hamujące aktywność fosfatazową a nie wpływające na aktywność nukleolityczną, indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego i proces apoptozy proliferujących monocytów U937 [53]. Mechanizm działania AaCDT analizowano również z wykorzystaniem komórek *Saccharomyces cerevisiae*, które nie syntetyzują 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu. W tych eksperymentach aktywność nukleolityczna była wystarczająca do wywołania przez białko CdtB efektu cytotoksycznego [41]. Obserwowane różnice w aktywnościach enzymatycznych różnych zmutowanych form CdtB mogą wynikać między innymi z odmiennej wrażliwości stosowanych w badaniach komórek eukariotycznych.

Główną funkcją podjednostek B toksyn AB jest rozpoznanie odpowiednich receptorów i zapewnienie transportu podjednostki A do cytozolu komórki docelowej. Różnorodność uzyskanych wyników eksperymentów, których celem było ustalenie receptora dla CDT sugeruje, że toksyny CDT, w zależności od pochodzenia, mogą wykazywać różną specyficzność receptorową. Udokumentowano, że EcCdtA-II, podobnie jak podjednostka C, wiąże na docelowych komórkach N-glikoproteiny zawierające fukozę [43], a toksyna AaCDT wiąże się z powierzchniowymi glikosfingolipidami (GM1, GM2, GM3 i Gb4 w przypadku CdtA; GM1 i GM2 w przypadku CdtC) [44]. Prezentowane wyżej dane zgodne są ze strukturalnymi analizami CtdA i CtdC. Występowanie w podjednostkach CtdA i CtdC domen lektynowych, podobnych do siebie nawzajem i do domeny roślinnej toksyny rycynowej, sugeruje ich powinowactwo do węglowodanowych receptorów [29, 46]. Odmienne dane zaprezentowali Eshraghi i wsp. Udokumentowali, że komórki linii CHO niezdolne do produkcji N-glikoprotein oraz glikosfingolipidów bądź niezdolne do biosyntezy fukozy są równie wrażliwe na działanie toksyn CDT pochodzących z *H. ducreyi*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. coli* i *C. jejuni* jak komórki CHO o niezmiennym fenotypie [16]. Dodatkowo dane przedstawione przez Boesze-Battaglia i wsp. sugerują, że AaCDT oddziałuje z mikrodomenami błonowymi bogatymi w cholesterol. M β CD (*methyl beta-cyclodextrin*), związek powodujący obniżenie poziomu cholesterolu, redukuje zdolność AaCDT i HdCDT do wiązania się odpowiednio z komórkami linii Jurkat i HeLa oraz chroni te komórki przed toksyczną aktywnością CDT [3].

Z badań Eshraghi i wsp. wynika, że również wiązanie AaCDT, HdCDT oraz EcCDT-III, ale nie CjCDT zależy od obecności cholesterolu w błonie komórek docelowych [16]. Ostatnio zidentyfikowano dwa geny (SGMS1 i TMEM181), których unieczynnienie sprawia, że komórki eukariotyczne stają się odporne na działanie EcCDT. Mutacje w genie SGMS1 obniżają poziom sfingomieliny, kluczowego składnika mikrodomen błonowych, przez co prawdopodobnie obniżają poziom oddziaływania toksyny z powierzchnią komórek eukariotycznych. Zlokalizowany na powierzchni komórek produkt drugiego genu, TMEM181, może także pełnić funkcję receptora. Nie można jednak wykluczyć, że białko to uwikłane jest jedynie w transport kompleksu toksyna-receptor przez błonę komórkową [6]. Poznanie receptora toksyny wymaga dalszych badań. Ostatnio opublikowane dane eksperymentów, w których z wykorzystaniem fluorescencji analizowano lokalizację poszczególnych podjednostek AaCDT w komórkach linii CHO-K1. CdtA odnajdywana była na powierzchni komórek docelowych niezależnie od obecności w ich błonach cholesterolu, podczas gdy CdtC była obecna w cytozolu komórek docelowych. Pozwoliło to autorom na postawienie hipotezy, że podjednostka CdtC pełni rolę białka opiekuńczego dla CdtB i jego rola w procesie rozpoznania receptorów jest tylko pomocnicza [11].

4. Mechanizm składania dojrzałej toksyny, struktura CDT

Składanie dojrzałej toksyny, będącej heterotrimerowym białkiem, ma miejsce na terenie peryplazmy. Sekwencje sygnałowe podjednostek są odcinane przez specyficzne proteazy podczas transportu przez błonę wewnętrzną komórki. Podjednostki CdtB i CdtC zaopatrzone są w klasyczne sekwencje sygnałowe, podczas gdy CdtA ma charakterystyczną dla lipoprotein sekwencję sygnałową rozpoznawaną przez sygnałną peptydazę II [27]. CdtA unikalne procesowanie podczas składania całego kompleksu i prawdopodobnie jest odpowiedzialna za transport dojrzałej toksyny przez błonę zewnętrzną komórki bakteryjnej [58]. Plazmid pUCA-cdtA zawierający gen *cdtA* warunkuje wytwarzanie dwóch immunopozytywnych białek o masie 25 kDa i 18 kDa [58]. Tylko CdtA o masie cząsteczkowej 18 kDa wchodzi w skład dojrzałej toksyny. Podobne procesowanie HdCdtA w *E. coli* zaobserwowali Frisk i wsp. [20].

Rozwiązanie struktur HdCDT, AaCDT oraz EcCdtB-II potwierdziło wcześniejsze dane otrzymane na drodze modelowania strukturalnego w oparciu o podobieństwo tych białek do eukariotycznej DNazyI oraz pozwoliło na częściowe wyjaśnienie mechanizmu składania kompleksu [28, 46, 72]. Wykazano m.in., że końce CdtA oraz CdtC o strukturze nieglobularnej stabilizują ostateczny

kompleks. Nesic i Stebbins skonstruowali trzy mutanty wytwarzające toksynę z CdtA z jedną z delecji na N-końcu ($\Delta 18-56$, $\Delta 18-67$ lub $\Delta 18-75$). Skutkiem tych zmian nie było obniżenie aktywności enzymatycznej, ale destabilizacja toksyny. Usunięcie większej liczby niż 75 aminokwasów z N-końca dawało podobny efekt. Tak więc ten fragment białka nie ma istotnego znaczenia dla aktywności ostatecznego kompleksu. Natomiast C koniec CdtA oddziałuje z CdtC. W wyniku usunięcia 8 aminokwasów CdtA ($\Delta 215-223$) odnotowano brak zdolności do prawidłowego zwinięcia kompleksu. Dodatkowo analiza mutantów delecyjnych w genie *cdtC* wykazała, że oddziaływanie CdtC z innymi podjednostkami jest bardzo istotne w montażu, stabilności i aktywności kompleksu. Delecja aminokwasów od 21 do 35 z N-końca CdtC nie wpływała na stabilność kompleksu, ale już brak 4 dodatkowych aminokwasów ($\Delta 21-39$) prowadził do znaczącej destabilizacji holo-toksyny i spadku jej aktywności. Aminokwasy podjednostki CdtC w pozycji od 169 do 178 uwikłane są w proces oddziaływania zarówno z CdtB jak i z CdtA. Struktura czwartorzędowa kompleksu wykazuje, że CdtA i CdtC uczestniczą w formowaniu dwóch istotnych powierzchniowych elementów dojrzalej toksyny: grupy wysoko konserwowanych aromatycznych reszt aminokwasowych i głębokiego rowka w miejscu styku tych podjednostek. Stosując mutagenезę specyficzną co do miejsca, udokumentowano istotny udział tych elementów strukturalnych w wiązaniu CDT do komórek docelowych i ich rolę w aktywności enzymatycznej ostatecznego kompleksu [47].

5. Losy CDT w komórkach docelowych

Wyjaśnienie mechanizmu wnikania CDT do komórek eukariotycznych wymaga dalszych badań ponieważ wyniki ostatnio wykonanych eksperymentów wskazują, że jest ona wydzielana do środowiska zewnętrznego za pomocą pęcherzyków błony zewnętrznej (OMVs – *outer membrane vesicles*), a nasza wiedza o uwalnianiu zawartości OMV do cytozolu komórek eukariotycznych jest jak dotąd bardzo ograniczona [40]. Dane dotyczące procesu wnikania CDT do komórek eukariotycznych pochodzą głównie z eksperymentów wykonanych *in vitro* z wykorzystaniem oczyszczonych białek. Po związaniu do odpowiednich receptorów, toksyna CDT jest pobierana na drodze endocytozy zależnej od dynaminy [9]. Następnie jest transportowana poprzez aparat Golgiego do retikulum endoplazmatycznego (ER) na drodze tzw. wtórnego transportu. Uszkodzenie aparatu Golgiego przez traktowane komórki brefeldyną A lub zablokowanie endocytozy hamuje ich intoksykację [9]. Translokacja podjednostki enzymatycznej toksyn z grupy AB z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu zwykle odbywa

się za pomocą szlaku ERAD (*ER associated degradation*). Jednak w przypadku HdCDT transport zachodzi niezależnie od ERAD lub znacznie się różni od mechanizmu używanego przez inne znane toksyny [23]. Wielu zwolenników ma teoria wskazująca na bezpośredni transport HdCdtB z ER do jądra komórkowego [37], tym bardziej, że metodami biochemicznymi nie udało się stwierdzić występowania omawianej toksyny w cytozolu zainfekowanych komórek eukariotycznych. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że wyniki eksperymentów nie są jednoznaczne i zależą od użytej strategii doświadczalnej [11]. Dotychczas dwie grupy badawcze wskazały na istnienie w obrębie AaCdtB i EcCdtB-II specyficznych sekwencji aminokwasowych NLS warunkujących kierowanie białka do jądra komórkowego. NLS w białku AaCdtB znajduje się na N-końcu i obejmuje aminokwasy 48–124. Delecja zaledwie 11 aminokwasów ($\Delta 114-124$ aa) wystarczy do zaburzenia transportu AaCdtB do jądra komórki docelowej/zniesienia cytotoxycywności CDT [49]. W białku EcCdtB-II zidentyfikowano dwie sekwencje aminokwasowe decydujące o jego lokalizacji jądrowej nazwane: NLS1 i NLS2. Interesujące jest to, że delecja każdej z tych sekwencji aminokwasowych powoduje odmienną lokalizację podjednostki toksyny [42]. Przeprowadzone badania sugerują, że NLS2 może działać jako sygnał uniemożliwiający „ucieczkę” CdtB do cytozolu, natomiast NLS1 odpowiadałaby za translokację z ER do jądra komórkowego. Interesujący aspekt biologii toksyny CDT stanowi kwestia obecności podjednostek A i C na którymkolwiek z etapów transportu. Model zaproponowany przez D a m e k - P o p r a w a i wsp. zakłada, że podjednostka CdtC wzmacniająca wiązanie z trawami lipidowymi poprzez odpowiedni motyw wiążący cholesterol (CRAC domena) jest także transportowana w formie dimeru z CdtB do wnętrza komórki i przechodzi drogę transportu wtórnego. Zgodnie z tym modelem oddysocjuje ona od dimeru w ER i podlega degradacji a uwolniona podjednostka B jest dostarczana do jądra [11].

6. Mechanizm intoksykacji komórki przez toksyny CDT

Uszkodzenia materiału genetycznego przez czynniki endogenne lub egzogenne indukuje aktywność mechanizmów zwanych odpowiedzią na uszkodzenia DNA (*DDR – DNA damage response*), których celem jest minimalizowanie niekorzystnych efektów. Mechanizmy te obejmują szlaki naprawy DNA i modulację aktywności punktów kontrolnych cyklu komórkowego głównie przez dwa szlaki sygnalizacyjne: zależny od kinazy ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) i zależny od czynnika ATR (*ATM and Rad3 related*). Aktywność odpowiednich białek gwarantuje zachowanie prawidłowej replikacji DNA i rozdzielenia chromosomów.

CdtB mająca aktywność DNazy I indukuje powstanie dwuniciowych pęknięć w DNA (DSB – *double strand breaks*), czego konsekwencją jest uruchomienie odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Komórki są nieodwracalnie zatrzymane w fazie G1 lub G2 i nie przechodzą mitozy [7]. Faza, w której zatrzymuje się cykl komórkowy zależy od typu komórek. I tak np. HdCDT blokuje cykl podziałowy nabłonkowych linii komórkowych (HeLa, Hep-2) i keratynocytów w fazie G2 [7, 74] a ludzkie fibroblasty blokowane są w fazie G1 oraz G2 [10, 62]. Limfocyty T mające kontakt z lizatem *Campylobacter upsaliensis*, blokowane są w fazie G2 i ostatecznie przechodzą apoptozę [45]. Mechanizm zatrzymania cyklu komórkowego indukowany w wyniku działania CDT jest podobny do tego indukowanego przez promieniowanie jonizujące [37]. W blokowanie cyklu komórkowego zaangażowana jest kinaza ATM, która ulega autofosforylacji w odpowiedzi na powstanie DSB [7]. Li i wsp. sugerują, że w ten proces zaangażowany jest także czynnik ATR [39]. Natomiast Shiloh uważa, że dwuniciowe pęknięcia w DNA prowadzą do aktywacji ATM, podczas gdy ATR jest aktywowany przez uszkodzenia DNA pojawiające się w wyniku działania promieniowania jonizującego [63]. Autofosforylacja ATM prowadzi do fosforylacji Chk2 (*checkpoint kinase 2*), która przeprowadza fosforylację CDC25C (fosfataza) w pozycji 216, co skutkuje utratą aktywności tego białka [7]. W niezaburzonym cyklu komórkowym ufosforylowane w pozycji treoniny 14 i tyrozyny 15 białko Cdc2 (*cell division cycle 2*) jest nieaktywne. Rozpoczęcie przez komórkę mitozy jest wynikiem aktywacji cykliny B/Cdc2, która zachodzi wskutek działania fosfatazy CDC25C. Konsekwencją utraty aktywności przez CDC25C jest brak defosforylacji cykliny B/Cdc2, co prowadzi do zatrzymania cyklu w G2/M lub przejścia komórek w stan starzenia [2, 7, 10, 57]. ATM aktywuje także czynnik transkrypcyjny p53. P53, którego poziom reguluje onkoproteina MDM2 (*mouse double minute 2*), bezpośrednio aktywuje p21 (inhibitor kinaz zależnych od cyklin). W fibroblastach lub keratynocytach zainfekowanych CDT fosforylacja p53 przez kinazę Chk2 prowadzi do oddysocjowania MDM2 i w efekcie do zwiększonej liczby cząsteczek p21 i wzrostu poziomu p27. Kompleks cdk2/cyklina E jest inaktywowany przez p21, czego konsekwencją jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Możliwe, że przewaga wstrzymania cyklu w G2/M obserwowana w większości doświadczeń może być związana z nieobecnością p53 w stosowanych do badań liniach komórkowych. ATM fosforyluje także histon H2AX prowadząc do aktywacji Mre11, kompleksu białek Rad50/NBS1/Mre11 związanych z naprawą DNA [39]. Fosforylacja H2AX wykrywana jest już godzinę po traktowaniu komórek DC (*dendritic cells*) HdCDT, a 2–3 godziny później następuje relokalizacja Mre11. Relokalizacja ta nie ma miejsca w przypadku traktowa-

nia komórek UV, co sugeruje, że aktywacja kompleksu związana jest z DSB [39]. W większości komórek (linie komórkowe CHO, Hep-2, HeLa) zainfekowanych CDT obserwuje się także montaż włókien stresowych aktyny [18; 74] odpowiedzialnych są za kształt komórki oraz zaangażowanych w jej mobilność. Przebudowa szkieletu aktynowego po dodaniu CDT wymaga aktywacji GTPazy RhoA zależnej od defosforylacji regulującego jej aktywność czynnika Net1 [22]. Białko RhoA wpływa na formowanie ognisk adhezji, co promuje przyczepianie się komórek do podłoża, reguluje ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcji oraz stymuluje proces proliferacji komórek [50]. Opisane zmiany cytoszkieletu aktynowego zachodzące w odpowiedzi na stres genotoksyczny są prawdopodobnie niezbędne do przeżycia komórki [18, 22, 56, 73]. W przedstawionym wyżej mechanizmie działania CDT zmiany indukowane przez DSB skutkują zatrzymaniem cyklu komórkowego i apoptozą komórek. Niektórzy autorzy sugerują odwrotny mechanizm, w którym fragmentacja DNA jest konsekwencją zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy oraz podkreślają rolę jednoniciowych pęknięć DNA w tym procesie. Obserwowane różnice mogą być zależne od rodzaju komórek oraz dawki toksyny użytych w eksperymentach [17, 19, 59]. Shenker i wsp. udokumentowali, jak wspomniano wyżej, że AaCDT wykazuje aktywność fosfatazy 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytoli (PIP3). Autorzy uważają, że blokowanie cyklu komórkowego przez toksynę głównie spowodowane jest aktywnością fosfatazy, a tylko czasami jej aktywnością DNazy [60], co zgodne jest to z wcześniejszą sugestią Sertai i wsp., że zablokowanie cyklu w punkcie kontrolnym G2/M nie zależy od powstawania DSB [57]. Dane eksperymentalne przedstawione przez Rabin i wsp., którzy stworzyli serię mutantów AaCdtB, zaprzeczają jednak tej hipotezie. Warianty CdtB H160G (zredukowana aktywność DNazy, a utrzymana aktywność fosfatazy PIP3) i CdtB D199G (obniżona aktywność DNazy i fosfatazy PIP3) nie powodują zablokowania cyklu komórkowego i apoptozy w proliferujących komórkach. Nie można jednak wykluczyć, że indukcja apoptozy w proliferujących komórkach U937 przez CDT wymaga aktywności zarówno DNazy jak i fosfatazy [53]. W przeciwieństwie do proliferujących komórek, apoptoza w nieproliferujących komórkach U937 nie wymaga aktywacji kaskady kaspaz i mobilizacji AIF (*apoptosis-inducing factor*). W dodatku w tych komórkach apoptoza występuje w wyniku działania CdtB D199G, CdtB H160G, niezmutowanej cząsteczki CdtB, oraz w obecności CdtB dzikiego typu z dodatkiem inhibitora fosfatazy PIP3 – bpV(pic) (*bispheroxo (picolinato) oxo-vanadate*). Sugeruje to, że apoptoza w nieproliferujących komórkach występuje niezależnie od aktywności fosfatazy PIP3 lub od aktywności DNazy [53]. Czy CDT pełni dwojaką funkcję i czy hydroliza PI-3,4,5-P3 do

PI-3,4-P2 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego wymaga dalszego wyjaśnienia. Istnieją także inne bardzo kontrowersyjne hipotezy dotyczące mechanizmu działania CDT. Schenker i wsp. w 2004 zasugerowali, że zatrucie komórki może być spowodowane kaskadą sygnałów pochodzącą z błony komórkowej docelowej komórki [58]. Jednak Guerra i wsp. udowodnili, że ingerencja w prawdopodobną drogę transportu tej toksyny, między innymi w funkcjonowanie aparatu Golgiego, chroni komórkę przed zablokowaniem cyklu komórkowego, jak również przed powstawaniem DSB w DNA komórek HeLa [23].

7. Nietypowa toksyna CDT wytwarzana przez *Salmonella enterica* serovar Typhi

Toksynę CDT produkuje również wewnątrzkomórkowy patogen *Salmonella enterica* sv. Typhi. W genomie tego mikroorganizmu nie odnaleziono genów kodujących białka wykazujące podobieństwo do sekwencji aminokwasowych podjednostek CdtA i CdtC, co było dość zaskakujące, bowiem wyniki przeprowadzonych wcześniej analiz wskazują, że obecność tych białek jest niezbędna do budowy aktywnego kompleksu toksyny. Składnik toksyny o aktywności enzymatycznej, homolog podjednostki CdtB, kodowany jest przez jeden z genów małej wyspy genomowej *Salmonella*. Białko to posiada Sec-zależny sygnał sekrecji i wszystkie reszty aminokwasowe istotne dla katalitycznej aktywności CdtB. Zaobserwowano, że ekstrakt zawierający jedynie SeCdtB, podobnie do CdtB produkowanych przez inne gatunki bakterii, nie wykazuje aktywności cytotoksycznej wobec komórek eukariotycznych. Natomiast aktywność kompleksu złożonego z CdtB *S. Typhi* oraz z podjednostek CdtA i CdtC pochodzących z komórek *C. jejuni* była porównywalna z aktywnością toksyny CDT wydzielanej przez pałeczki *Campylobacter*. Ponadto stwierdzono, że pomimo braku homologów podjednostek CdtA i CdtC w proteomie *S. Typhi*, w komórkach nabłonka jelita zainfekowanych przez ten mikroorganizm dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego i charakterystycznych zmian powodowanych obecnością toksyny CDT [25]. Oznacza to, że w komórkach *S. enterica* sv. Typhi podjednostka CdtB jest transportowana bez udziału białek CdtC i CdtA. Kolejne obserwacje wykazały, że produkcja toksyny jest ściśle uzależniona od procesu internalizacji bakterii. Białko to powstaje jedynie wtedy, gdy patogen znajduje się wewnątrz zainfekowanej komórki. CdtB musi więc mieć możliwość przedostawania się przez błonę wakuoli, w której *Salmonella* przebywa na pierwszym etapie infekcji (SCV, *Salmonella*-containing vacuole). Genom *Salmonella* koduje dwa systemy sekrecji typu trzeciego (TTSS SPI-1 oraz TTSS SPI-2), żaden z nich nie uczestniczy jednak w transporcie CdtB do

cytozolu komórek eukariotycznych [25]. Spano i wsp. wykazali, że w komórkach *Salmonella* aktywną toksynę CDT tworzą oprócz CdtB, dwa białka, PltA i PltB, kodowane przez tę samą wyspę genomową co CdtB i podobnie jak CdtB produkowane jedynie wewnątrz zainfekowanej przez patogen komórki. PltA (*pertussis-like toxin A*) jest ortologiem ADP-rybozylującej podjednostki A toksyny *Bordetella pertussis*, podczas gdy PltB (*pertussis-like toxin B*) wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do jednego z pięciu składników podjednostki B tej toksyny. Transport CdtB na zewnątrz komórek eukariotycznych zainfekowanych przez *Salmonella*, odbywa się więc prawdopodobnie z udziałem białek PltA i PltB. Kompleks CdtB/PltA/PltB wydzielany jest na zewnątrz komórek eukariotycznych, po czym wykazuje toksyczne działanie zarówno w odniesieniu do komórek wcześniej zainfekowanych (droga autokrynną) jak i niezainfekowanych (droga parakrynną), choć efekt cytotoksyczny jest szybciej widoczny w tym drugim przypadku. Dodanie do środowiska przeciwciał rozpoznających CdtB zapobiega intoksykacji komórek eukariotycznych, zarówno zainfekowanych jak i niezainfekowanych [66, 67]. Zaproponowano o hipotezę, według której komórki nie posiadające receptora dla toksyny CDT, a więc odporne na autokrynną ścieżkę transporu toksyny, mogą stanowić „bezpieczne schronienie” dla komórek *Salmonella* i jednocześnie stanowić źródło toksyny CDT oddziałującej na komórki posiadające na swej powierzchni właściwe receptory. Powyższy stan mógłby odpowiadać za powstawanie chronicznej infekcji, typowej dla serowaru Typhi. Ocena wiarygodności tego modelu wymaga przeprowadzenia jeszcze wielu badań.

8. Podsumowanie

CDT jest powszechnie występującą genotoksyną bakterii gramujemnych składającą się z trzech jednostek: CdtA, CdtB i CdtC. Podjednostka CdtB wykazuje aktywność DNazy oraz fosfatazy podczas gdy CdtA i CdtC oddziałują z błoną komórkową komórek docelowych i dostarczają podjednostkę katalityczną do wnętrza komórki. Dokładna rola CdtA i CdtC w procesie intoksykacji komórek, podobnie jak rola aktywności CdtB (nukleaza vs fosfataza) w modulacji cyklu komórkowego nadal wymagają wyjaśnienia. Translokacja CdtB do jądra powoduje uszkodzenie materiału genetycznego gospodarza, uruchamiając kaskadę sygnałów prowadzącą między innymi do aktywacji mechanizmów naprawy materiału genetycznego, zatrzymania cyklu komórkowego na poziomie G1/S lub G2/M oraz indukcji procesów starzenia lub apoptozy komórek. Mechanizm działania CDT sugeruje, że tworzenie DSB może być strategią bakterii pozwalającą na modulowanie funkcji życiowych

gospodarza. Dotychczasowe badania skupiały się szczególnie na analizach aktywności CDT *in vitro*, badaniach biochemicznych a ostatnio strukturalnych. Stosunkowo mało jest dostępnych danych na temat roli toksyn CDT w procesach wirulencji *in vivo*. Potencjalnym mechanizmem działaniem tej genotoksyny jest inhibicja proliferacji komórek nabłonka i indukcja ich apoptozy, co umożliwia inwazję bakterii oraz zahamowanie proliferacji komórek odpowiedzi immunologicznej, czego efektem jest lokalna immunosupresja. Wywoływane objawy chorobowe uwarunkowane aktywnością CDT są różne i zależne od gatunku patogenu i kolonizowanej niszy ekologicznej. I tak np. CDT *A. actinomycescomitans* przyczynia się do zapalenia ozębnej powodując zanik tkanki kostnej, podczas gdy CDT *H. ducreyi* opóźnia gojenie się ran po przez wpływ na poziom indukowanej odpowiedzi immunologicznej. Coraz więcej danych eksperymentalnych wskazuje na fakt, że w wypadku chronicznych infekcji powodowanych np. przez *H. hepaticus* czy *C. jejuni* wytwarzanie CDT przez patogenne mikroorganizmy może być przyczyną indukcji procesu nowotworzenia [34].

Piśmiennictwo

Ze względu na dużą liczbę opublikowanych prac dotyczących genotoksyny CDT cytowana literatura nie jest wyczerpująca aczkolwiek w opinii autorów jest reprezentatywna.

- Bielaszewska M., Sinha B., Kuczius T., Karch H.: Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect. Immun.* **73**, 552–562 (2005)
- Blažkova H., Krejčikova K., Moudry P., Frisan T., Hodny Z., Bartek J.: Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 357–367 (2010)
- Boesze-Battaglia K., Besack D., McKay T., Zekavat A., Otis L., Jordan-Sciutto K., Shenker B.J.: Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycescomitans* cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* **8**, 823–836 (2006)
- Cao L., Bandelac G., Volgina A., Korostoff J., DiRienzo J.M.: Role of aromatic amino acids in receptor binding activity and subunit assembly of the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycescomitans*. *Infect. Immun.* **76**, 2812–2821 (2008)
- Cao L., Volgina A., Huang C.M., Korostoff J., DiRienzo J.M.: Characterization of point mutations in the *cdtA* gene of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Mol. Microbiol.* **58**, 1303–1321 (2005)
- Carette J.E., Brummelkamp T.R. i wsp.: Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science*, **326**, 1231–1235 (2009)
- Ceelen L.M., Decostere A., Ducatelle R., Haesebrouck F.: Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol. Res.* **161**, 109–120 (2006)
- Cortes-Bratti X., Chaves-Olarte E., Lagergard T., Thelestam M.: The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *J. Clin. Invest.* **103**, 107–115 (1999)
- Cortes-Bratti X., Chaves-Olarte E., Lagergard T., Thelestam M.: Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **68**, 6903–6911 (2000)
- Cortes-Bratti X., Karlsson C., Lagergard T., Thelestam M., Frisan T.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 5296–5302 (2001)
- Damek-Poprawa M., Jang J.Y., Volgina A., Korostoff J., DiRienzo J.M.: Localization of *Aggregatibacter actinomycescomitans* cytolethal distending toxin subunits during intoxication of live cells. *Infect. Immun.* **80**, 2761–2770 (2012)
- Dean P.: Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 1100–1125 (2011)
- Delepelaire P.: Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 149–161 (2004)
- Elwell C., Chao K., Patel K., Dreyfus L.: *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect. Immun.* **69**, 3418–3422 (2001)
- Elwell C.A., Dreyfus L.A.: DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* **37**, 952–963 (2000)
- Eshraghi A., Maldonado-Arocho F.J., Gargi A., Cardwell M.M., Prouty M.G., Blanke S.R., Bradley K.A.: Cytolethal distending toxin family members are differentially affected by alterations in host glycans and membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* **285**, 18199–18207 (2010)
- Fedor Y., Vignard J., Nicolau-Travers M.L., Boutet-Robinet E., Watrin C., Salles B., Mirey G.: From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cell Microbiol.* **15**, 1–15 (2013)
- Frisan T., Cortes-Bratti X., Chaves-Olarte E., Stenerlow B., Thelestam M.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol.* **5**, 695–707 (2003)
- Frisan T., Cortes-Bratti X., Thelestam M.: Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 495–499 (2002)
- Frisk A., Lebens M., Johansson C., Ahmed H., Svensson L., Ahlman K., Lagergard T.: The role of different protein components from the *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in the generation of cell toxicity. *Microb. Pathog.* **30**, 313–324 (2001)
- Gargi A., Reno M., Blanke S.R.: Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 124 (2012)
- Guerra L., Carr H.S., Richter-Dahlfors A., Masucci M.G., Thelestam M., Frost J.A., Frisan T.: A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS One*, **3**, e2254 (2008)
- Guerra L., Nemeček K.N., Massey S., Tatulian S.A., Thelestam M., Frisan T., Teter K.: A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 489–495 (2009)
- Guerra L., Frisan T. i wsp.: Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol.* **7**, 921–934 (2005)
- Haghjoo E., Galan J.E.: *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4614–4619 (2004)

26. Hassane D.C., Lee R.B., Mendenhall M.D., Pickett C.L.: Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infect. Immun.* **69**, 5752–5759 (2001)
27. Heywood W., Henderson B., Nair S.P.: Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J. Med. Microbiol.* **54**, 207–216 (2005)
28. Hontz J.S., Villar-Lecumberri M.T., Dreyfus L.A., Yoder M.D.: Crystallization of *Escherichia coli* CdtB, the biologically active subunit of cytolethal distending toxin. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 192–195 (2006)
29. Hu X., Stebbins C.E.: Dynamics and assembly of the cytolethal distending toxin. *Proteins*, **65**, 843–855 (2006)
30. Jinadasa R.N., Bloom S.E., Weiss R.S., Duhamel G.E.: Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*, **157**, 1851–1875 (2011)
31. Johnson W.M., Lior H.: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* **4**, 115–126 (1988)
32. Johnson W.M., Lior H.: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb. Pathog.* **4**, 103–113 (1988)
33. Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G.: The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 336–351 (2012)
34. Lagergård T., Keith J.: Cytolethal distending toxin as virulence factor, protective antigen, and target for vaccine development. *Vaccine: Develop. Therapy*, **2**, 51–60 (2012)
35. Lara-Tejero M., Galan J.E.: A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, **290**, 354–357 (2000)
36. Lara-Tejero M., Galan J.E.: CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* **69**, 4358–4365 (2001)
37. Lara-Tejero M., Galan J.E.: Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol.* **10**, 147–152 (2002)
38. Lee R.B., Hassane D.C., Cottle D.L., Pickett C.L.: Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect. Immun.* **71**, 4883–4890 (2003)
39. Li L., Sharipo A., Chaves-Olarte E., Masucci M.G., Levitsky V., Thelestam M., Frisan T.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol.* **4**, 87–99 (2002)
40. Lindmark B., Wai S.N. i wsp.: Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* **9**, 220 (2009)
41. Matangkasombut O., Wattanawaraporn R., Tsuruda K., Ohara M., Sugai M., Mongkolsuk S.: Cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces DNA damage, S/G2 cell cycle arrest, and caspase-independent death in a *Saccharomyces cerevisiae* model. *Infect. Immun.* **78**, 783–792 (2010)
42. McSweeney L.A., Dreyfus L.A.: Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. *Cell Microbiol.* **6**, 447–458 (2004)
43. McSweeney L.A., Dreyfus L.A.: Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits. *Infect. Immun.* **73**, 2051–2060 (2005)
44. Mise K., Akifusa S., Watarai S., Ansai T., Nishihara T., Takehara T.: Involvement of ganglioside GM3 in G(2)/M cell cycle arrest of human monocytic cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **73**, 4846–4852 (2005)
45. Mooney A., Clyne M., Curran T., Doherty D., Kilmartin B., Bourke B.: *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells and T lymphocytes. *Microbiology*, **147**, 735–743 (2001)
46. Nescic D., Hsu Y., Stebbins C.E.: Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature*, **429**, 429–433 (2004)
47. Nescic D., Stebbins C.E.: Mechanisms of assembly and cellular interactions for the bacterial genotoxin CDT. *PLoS Pathog.* **1**, e28 (2005)
48. Nishikubo S., Sugai M. i wsp.: Single nucleotide polymorphism in the cytolethal distending toxin B gene confers heterogeneity in the cytotoxicity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **74**, 7014–7020 (2006)
49. Nishikubo S., Sugai M. i wsp.: An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J. Biol. Chem.* **278**, 50671–50681 (2003)
50. Nowak J.M., Grzanka A., Zurzyn A., Stepień A.: The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton. *Post. Hig. Med. Dośw.* **62**, 110–117 (2008)
51. Ohara M., Oswald E., Sugai M.: Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J. Biochem.* **136**, 409–413 (2004)
52. Peres S.Y., Oswald E. i wsp.: A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* **24**, 1095–1107 (1997)
53. Rabin S.D., Flitton J.G., Demuth D.R.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. *Infect. Immun.* **77**, 3161–3169 (2009)
54. Saiki K., Gomi T., Konishi K.: Deletion and purification studies to elucidate the structure of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *J. Biochem.* **136**, 335–342 (2004)
55. Saiki K., Konishi K., Gomi T., Nishihara T., Yoshikawa M.: Reconstitution and purification of cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol. Immunol.* **45**, 497–506 (2001)
56. Sato T., Nishihara T. i wsp.: p53-independent expression of p21(CIP1/WAF1) in plasmacytic cells during G(2) cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **70**, 528–534 (2002)
57. Sert V., Cans C., Tasca C., Bret-Bennis L., Oswald E., Ducommun B., De Rycke J.: The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene*, **18**, 6296–6304 (1999)
58. Shenker B.J., Besack D., McKay T., Pankoski L., Zekavat A., Demuth D.R.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (Cdt): evidence that the holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. *J. Immunol.* **172**, 410–417 (2004)
59. Shenker B.J., Demuth D.R., Zekavat A.: Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. *Infect. Immun.* **74**, 2080–2092 (2006)
60. Shenker B.J., Dlakic M., Walker L.P., Besack D., Jaffe E., LaBelle E., Boesze-Battaglia K.: A novel mode of action for a microbial-derived immunotoxin: the cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase activity. *J. Immunol.* **178**, 5099–5108 (2007)
61. Shenker B.J., Hoffmaster R.H., McKay T.L., Demuth D.R.: Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB

- protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. *J. Immunol.* **165**, 2612–2618 (2000)
62. Shenker B.J., McKay T., Datar S., Miller M., Chowhan R., Demuth D.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. *J. Immunol.* **162**, 4773–4780 (1999)
 63. Shiloh Y.: ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 71–77 (2001)
 64. Smith J.L., Bayles D.O.: The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**, 227–248 (2006)
 65. Solyers A.A., Whitt D.D., Bacterial Exotoxins: Important but still a mystery (w) Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. Second edition, Washington D. C., 2002, s. 131–149
 66. Spano S., Galan J.E.: A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 15–20 (2008)
 67. Spano S., Ugalde J.E., Galan J.E.: Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*, **3**, 30–38 (2008)
 68. Toth I., Herault F., Beutin L., Oswald E.: Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4285–4291 (2003)
 69. Toth I., Nougayrede J.P., Dobrindt U., Ledger T.N., Boury M., Morabito S., Oswald E.: Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **77**, 492–500 (2009)
 70. Voth D.E., Broederdorf L.J., Graham J.G.: Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol.* **7**, 241–257 (2012)
 71. Wising C., Lagergard T. i wsp.: Toxicity and immunogenicity of purified *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in a rabbit model. *Microb. Pathog.* **33**, 49–62 (2002)
 72. Yamada T., Komoto J., Saiki K., Konishi K., Takusagawa F.: Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): crystal structure of CDT from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Protein Sci.* **15**, 362–372 (2006)
 73. Yamamoto K., Tominaga K., Sukedai M., Okinaga T., Iwanaga K., Nishihara T., Fukuda J.: Delivery of cytolethal distending toxin B induces cell cycle arrest and apoptosis in gingival squamous cell carcinoma *in vitro*. *Eur. J. Oral Sci.* **112**, 445–451 (2004)
 74. Young V.B., Knox K.A., Schauer D.B.: Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* **68**, 184–191 (2000)

SPIS TREŚCI

K. Szczypa, J. Wilemska, W. Hryniewicz, I. Sitkiewicz – Epidemiologia zakażeń <i>Streptococcus pyogenes</i> , struktura klonalna populacji i antybiotykooporność	223
Z. Bakuła, R. Stachowiak, <u>J. Wiśniewski</u> , L. Granicka, J. Bielecki – Immobilizacja komórek – znaczenie biomedyczne	233
A. Matusiak, M. Chmiela – Choroba niedokrwienna serca a zakażenia bakteryjne <i>Helicobacter pylori</i> i <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> – rola białek szoku cieplnego i zjawisko mimikry antygenowej	247
E. Nikonorow, A. Baraniak, M. Gniadkowski – Oporność bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz	261
P. Łaniewski, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Immunoprofilaktyka zakażeń <i>Campylobacter</i>	273
P. Łaniewski, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Konstrukcja szczepionek podjednostkowych z wykorzystaniem komórek <i>Salmonella enterica</i> jako nośnika heterologicznych genów	281
T. Jagielski, E. Rup, A.B. Macura, J. Bielecki – Charakterystyka grzybów z rodzaju <i>Malassezia</i> . I. Aspekty mikrobiologiczne i immunologiczne	295
T. Jagielski, E. Rup, A.B. Macura, J. Bielecki – Charakterystyka grzybów z rodzaju <i>Malassezia</i> . II. Aspekty kliniczne	307
P. Kobierecka, A. Wszyńska, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Charakterystyka genotoksyn CDT (cytolethal distending toxin)	315

CONTENTS

K. Szczypa, J. Wilemska, W. Hryniewicz, I. Sitkiewicz – Epidemiology of <i>Streptococcus pyogenes</i> infections, clonal structure population and antibiotic resistance	223
Z. Bakuła, R. Stachowiak, <u>J. Wiśniewski</u> , L. Granicka, J. Bielecki – Cell immobilization – biomedical significance	233
A. Matusiak, M. Chmiela – Coronary heart disease versus <i>Helicobacter pylori</i> and <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> bacterial infections – the role of heat shock proteins and the phenomenon of antigenic mimicry	247
E. Nikonorow, A. Baraniak, M. Gniadkowski – β -Lactamase-mediated resistance in <i>Enterobacteriaceae</i>	261
P. Łaniewski, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Anti- <i>Campylobacter</i> immunoprophylaxis	273
P. Łaniewski, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Subunit vaccine construction using <i>Salmonella enterica</i> cells as a carrier of heterologous genes	281
T. Jagielski, E. Rup, A.B. Macura, J. Bielecki – Characterization of fungi of the <i>Malassezia</i> genus. I. Microbiological and immunological aspects	295
T. Jagielski, E. Rup, A.B. Macura, J. Bielecki – Characterization of fungi of the <i>Malassezia</i> genus. II. Clinical aspects	307
P. Kobierecka, A. Wszyńska, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Characterization of CDT (cytolethal distending toxin) genotoxins	315

