

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY**  
**KATEDRA BIOCHEMIE**



Bakalářská práce

**VYTYPOVÁNÍ ANTIGENŮ VIRULENČNÍCH  
FAKTORŮ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRO ÚČELY  
PASIVNÍ IMUNIZACE**

Martina Kosová

Školitel bakalářské práce: Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.

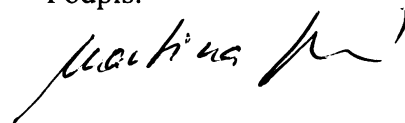
PRAHA, 2006

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Hodka, CSc. A všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

*Praha, 7.6.2006*

Podpis:



Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Doc. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za cenné rady a pomoc při psaní této práce.

## **Obsah bakalářské práce:**

Seznam použitých zkratk	2
<b>1. Úvod</b>	3
<b>2. Cíl práce</b>	3
<b>3. <i>Pseudomonady</i></b>	3
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
3.2. <i>Burkholderia cepacia</i>	7
3.3. Patogenita	8
3.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (+ <i>Burkholderia cepacia</i> ) a cystická fibróza	10
3.3.2. Cystická fibróza	12
3.3.3. Jiné rizikové faktory pro onemocnění <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3.3.4. Způsobená onemocnění	21
3.4. Terapie	22
3.4.1. Léčba antibiotiky	22
3.4.2. Aktivní versus pasivní imunizace proti oportunním infekcím	25
<b>4. Virulenční a s virulencí spojené faktory <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	27
4.1. Vybrané antigeny pro imunizaci	28
4.1.1. Celé bakterie	29
4.1.2. Exotoxin A	30
4.1.3. Lipopolysacharid	30
4.1.4. Vnější membránové proteiny (především OprF)	38
4.1.5. Flagella (bičík)	46
4.1.6. Pili (fimbrie)	50
<b>5. Pasivní imunizace</b>	55
5.1. Hlavní funkce imunitního systému	55
5.2. Protilátky	56
5.2.1. Protilátky (lidské, tedy savčí)	56
5.2.2. Slepičí protilátky	58
<b>6. Závěr – vytypované antigeny</b>	61
<b>7. Shrnutí</b>	63
<b>8. Seznam použité literatury</b>	65

## Seznam použitých zkratek:

PA...*Pseudomonas aeruginosa*

BC...*Burkholderia cepacia*

CF...cystická fibróza

CFTR....Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

GIT...gastrointestinální trakt

LPS...lipopolysacharid

Ig...imunoglobuliny

IgY...slepičí imunoglobulin

A...aktivní imunizace

P...pasivní imuizace

OprF...vnější membránový protein F

OprI...vnější membránový protein I

LD<sub>50</sub>...letální dávka, při které nepřežije 50 % z pokusných zvířat

*E. coli*...*Escherichia coli*

OMP...vnější membránový protein

APC..antigen prezentující buňka

AK...aminokyselina

ELISA...enzyme-linked immunosorbent assay, imunochemická metoda

SDS...sodium dodecyl sulfát

IL-8...interleukin 8, chemokin

PMN...polymorfonukleárové

DSL...disulfidová smyčka

IFN...gama interferon

TNF...tumor nekrotizující faktor

## 1. Úvod

*Pseudomonas aeruginosa* je bakterie, která může vystupovat jako oportunní lidský patogen. Pro rizikové skupiny potencionálních pacientů je velmi nebezpečná, způsobuje vážné infekce. Významnou skupinou takto ohrožených jedinců jsou pacienti trpící cystickou fibrózou, pro které jsou infekce *Pseudomonas aeruginosa* často i smrtelné.

## 2. Cíl práce

Jelikož tato bakterie prokazuje velkou rezistenci na širokou škálu antibiotik, bylo by vhodné navrhnout nějakou účinnou očkovací metodu, která by výskyt infekcí zásadně omezila nebo/a zlepšila průběh probíhajících infekcí. Cílem této práce je proto literární přehled týkající se této problematiky a vytypování antigenů, které by byly vhodné pro účely pasivní imunizace.

## 3. *Pseudomonady*



Obr.1. Obrázky *Pseudomonad*: A. Elektronmikroskopický snímek, B. Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu, C. Gramovo barvení [<http://textbookofbacteriology.net>]

Je to gramnegativní aerobní tyčinkovitá bakterie (viz Obr.1.). Vyskytuje se v odpadních vodách, v půdě a také vzácněji ve stolici lidí a domácích zvířat. Velmi často se nalézá v nemocničním prostředí: na jednotkách intenzivní péče, novorozeneckých odděle-

ních, na stomatologickém oddělení - kde může kontaminovat různé lékařské náčiní. Z tohoto důvodu způsobuje často nemocniční nákazy - tzv. nosokomiální infekce. [Bednář a kol., 1996]

Hrají důležitou roli v aerobní dekompozici, biodegradaci a přírodních cyklech prvků uhlíku a dusíku. Mají schopnost rozkládat stovky organických sloučenin. Mezi nimi například: plasty, pesticidy, herbicidy, insekticidy, petroleové substance, mastné kyseliny, různé alifatické i aromatické uhlovodíky a jiné těžce rozložitelné a odolné organické molekuly znečišťující životní prostředí. Neumí ovšem degradovat teflon, jednouchlíkaté sloučeniny (methan, methanol, formaldehyd), biopolymery – celulózu a lignin a jejich role v anaerobním rozkladu je minimální.

Existuje asi 150 druhů bakterií, které se mohou řadit do širokého rodu *Pseudomonas* a jejich příbuzným rodům. *Pseudomonas aeruginosa* je ovšem typickým představitelem tohoto rodu.

Charakteristickými znaky jsou tyto fyziologické vlastnosti: chemoorganotrofie, aerobní metabolismus, neschopnost fermentace, fotosyntézy a fixace dusíku a možnost růstu na mnoha organických substrátech. Disimilují cukry Entner-Doudoroff cestou. Samozřejmě existují výjimky z této poměrně přesné fyziologické charakterizace. Některé druhy umí fixovat vzdušný dusík (*Pseudomonas stutzeri*). *Pseudomonas aeruginosa* je po fenotypickém „shiftu“, který se odehrává při kolonizaci hostitelské tkáně schopna anaerobní respirace využívající  $\text{NO}_3$  (jako finálního elektronového akceptoru, jde o denitrifikaci). [<http://textbookofbacteriology.net>]

*Pseudomonady* mají velmi malé nutriční požadavky a rostou v neutrálním pH. Nevadí jim ani vysoké koncentrace solí nebo barviv. Jejich optimální kultivační teplota je v rozmezí 30 - 37°C, ale rostou obvykle i při pokojové teplotě. [Bednář a kol., 1996] Jsou to poměrně nenáročné bakterie, co se týče podmínek jejich kultivace.

Pohybují se pomocí jednoho či více polárních bičíků, ale byla u nich zjištěna i chemotaxe a aerotaxe. Mají často velké množství plasmidů, které si mezi sebou hojně a snadno vyměňují.

Mezi oportunní patogeny patří hlavně *Pseudomonas aeruginosa* a příležitostně také *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas putida*. Z příbuzných druhů je to pak hlavně *Burkholderia cepacia*. Nejdůležitější lidské patogeny PA a BC probereme podrobněji dále. V této práci se věnujeme hlavně PA, ale jelikož je BC příbuzná bakterie, tak některé údaje

o PA jsou s ní také spojené a proto i možná potenciální pasivní imunizace proti BC infekcím by možná byla účinná se stejným nebo podobným antigenem jako u PA.

### 3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Jak již bylo zmíněno, *Pseudomonas aeruginosa* je typickým představitelem rodu *Pseudomonas*. Je přísně definována, nejsnadněji identifikována a její genom byl sekvenován.

PA se rozlišuje dle termostabilních somatických antigenů na 17 sérotypů. Další antigeny jsou ještě vázány na bičíky a fimbrie. Různé druhy PA obsahují třeba i jiné virulenní faktory a jsou tedy podle toho více či méně virulentní.

Existují tři typy kolonií, které může PA vytvářet (viz Obr.2.):

- malé hrubé nepravidelné kolonie – produkují PA izolované z půdy či vody
- rozsáhlé, hladké, s plochými konci – klinické vzorky z pacientů trpících akutní infekcí PA
- mukoidní, s alginátovým slizovým obalem – klinické vzorky z chronicky kolonizovaných pacientů, nejčastěji z respiračního (pacienti CF) či vylučovacího traktu



Obr.2. Kolonie *Pseudomonas aeruginosa* na agaru [<http://textbookofbacteriology.net>]

Plasmidy, které mohou PA obsahovat jim často propůjčují rezistenci k mnoha antibiotikům a jiným antibakteriálním látkám. Tato rezistence je také z části odůvodněna jejich přirozeným sklonem vytvářet si anaerobní biofilm, přes který se antibiotika nedostanou.

PA tvoří rozpustné pigmenty: modrozelený pyocyanin (methyllhydrofenazin) a žlutozelený fluorescein. [Bednář a kol., 1996] PA je jediným známým producentem pyocyaninu (viz Obr.3.). Často ještě také produkuje pyoverdin – fluoreskující pigment a někdy i červený pyorubin nebo hnědý pyomelanin. Fluorescenční pigmenty působí jako siderofory při přijímání železa z okolí (jejich produkce je výrazně zvýšena při nedostatku železa). Některé tyto pigmenty působí také jako virulenční faktory. [http://textbookofbacteriology.net]



Obr.3. Rozpustný modrý pigment pyocyanin je produkován mnoha kmeny *Pseudomonas aeruginosa* [http://textbookofbacteriology.net]



### 3.2. *Burkholderia cepacia*



Obr.4. *Burkholderia cepacia* obklopena plicními neutrofily ve sputu pacienta CF [Parke a kol., 2000]

Je to gramnegativní pohyblivá tyčinka. Prvně byla popsána roku 1949 jako původce hniloby cibulovitých rostlin. Později bylo zjištěno, že je schopna způsobovat nosokomiální infekce a zařadila se tak mezi nebezpečné humánní oportunní patogeny. Nejčastěji byla zachycena u imunosupresivních pacientů a u pacientů trpících cystickou fibrózou. [www.laboratoř molekulární genetiky]

Byla dříve známa pod jménem *Pseudomonas cepacia*, ale poté byla zařazena do své vlastní skupiny. Má také jako PA minimální nutriční požadavky a může růst dokonce i na penicilinu G. [<http://textbookofbacteriology.net>]

BC je rezistentní vůči mnoha druhům antibiotik.

### 3.3. Patogenita

Bakterie PA se mohou uplatňovat jako patogeny dýchacího traktu, vylučovací soustavy, při různých zraněních (výskyt PA při zraněních se projevuje modrým hnisem, způsobovaným právě pyocyaninem anebo fluorescencí) a také se nachází v krvi. Protože je bakterie tak nenáročná na nutriční požadavky, je přítomna v nejrůznějších prostředích: často kontaminuje lékařské přístroje, je nalézána v lécích, kosmetických přípravcích a preparátech obsahujících rostlinné látky, v potravě.

Patogenita PA je multifaktoriální – díky celé řadě virulenčních faktorů produkovaných PA. Na patogenitě se ze strany mikroba uplatňují jednak faktory vázané na bakteriální buňku (extracelulární polysacharid, slizová vrstva, stěnový lipopolysacharid), jednak extracelulární produkty (enzymy, toxiny, pigmenty). [Bednář a kol., 1996]

**Infekce PA** má 3 fáze:

- 1) adherence na hostitelskou tkáň
- 2) akutní infekce
- 3) chronická infekce

#### **1) adherence na hostitelskou tkáň**

PA se pomocí svých pili adhezuje na epitelální buňky (často respiračního traktu). Funkci specifických receptorů pro tyto pili mají sacharidy jako galaktosa, mannososa nebo sialová kyselina exponované v glykolipidech na povrchu membrán epitelálních buněk. Ke schopnosti bakterie adherovat se na epitelální buňky přispívá také bičík a některé vnější membránové proteiny (OprF).

Kromě toho také mukoidní polysacharid – alginát a exoenzym S pravděpodobně hrají svou roli v bakteriální adhezi. Je-li epitelální tkáň nějakým způsobem poškozená (zranění, hlenový sekret, atd.), jsou tyto monosacharidy zřejmě lépe dostupné a nastává tudíž větší riziko, že se bakterie na tkáni uchytlí.

#### **2) akutní infekce**

Akutní infekce se většinou projevuje do určitého počtu vyskytujících se bakterií. V této fázi se dá ještě léčit. Na průběh infekce má vliv mnoho faktorů, ať už samotný stav pacienta, tak množství různých virulenčních faktorů, kterými jednotlivé bakterie na hostitelský organismus působí.

Schopnost PA napadnout hostitelskou tkáň a vyvolat infekci závisí na její produkci extracelulárních enzymů a toxinů, které narušují fyzikální bariéry a poškozují hostitelskou buňku a také na rezistenci PA k fagocytóze a k hostitelskému imunitnímu obrannému systému. Funkce některých těchto faktorů virulence jsou uvedeny dále: [http://textbookofbacteriology.net], [Bednář a kol., 1996]

- elastasa – štěpí kolagen, kasein, elastin, IgA, IgG, inaktivuje komplement, rozkládá fibronektin, narušuje respirační epitel a řasinky, inaktivuje IFN a TNF
- alkalická proteasa – rozkládá fibrin, inaktivuje IFN a TNF
- pyocyanin – inhibitor mitochondriálních enzymů, narušuje tkáň, snižuje pohyb řasinek
- hemolysiny (fosfolipasa a lecitinasa) – narušuje tkáň a napomáhá lepšímu množení bakterií
- exotoxin A – má transferázovou aktivitu, katalyzuje přenos adenosinfosfát ribózy z NAD na elongační faktor 2 a tím inhibuje proteosyntézu v buňce

Imunitní reakce je kromě počátečních fází přirozené imunity (kdy působí polymorfonukleáry) vázána hlavně na IgM, které zvyšují opsonizaci a napomáhají tudíž fagocytóze. Komplement s protilátkou nepůsobí zpravidla na virulentní kmeny baktericidně. [Bednář a kol., 1996]

### **3) chronická infekce**

Chronická infekce PA je definována jako trvalá perzistence bakterie po dobu minimálně 6 měsíců nebo jako signifikantní vzestup protilátek. Charakteristickým příznakem perzistující chronické infekce PA je produkce mukoidního alginátu a tvorba mikrokolonií, které jsou špatně propustné pro antibiotika. [Vávrová a kol., 1999] Dochází zde k takzvanému fenotypovému shiftu, bakterie mění způsob výživy, jde o anaerobní respiraci využívající  $\text{NO}_3$ . V tomto stadiu infekce se říká, že bakterie kolonizovala hostitele a léčení této fáze již ani není příliš možné.

Také u zdravého člověka se výjimečně tato bakterie může objevit a způsobit i menší infekci. Patogenita této bakterie je však do značné míry ovlivněna současným stavem napadnuté osoby. Nebezpečí vzniku infekce je převážně mezi ohroženými skupinami pacientů, které mají jisté predispozice ke vzniku PA infekce dle rizikových faktorů, které již byly dříve popsány.

Dezinfekční účinek proti PA mají chlorované preparáty. [Bednář a kol., 1996]

### **3.3.1. *Pseudomonas aeruginosa* (+ *Burkholderia cepacia*) a cystická fibróza**

#### ***Pseudomonas aeruginosa***

Významným faktorem pro rozvoj plicního poškození je chronická infekce *Pseudomonas aeruginosa*, která je zodpovědná za velkou část morbiditu a mortality CF pacientů. Kolonizace touto bakterií roste s věkem, v dospělém věku bývá kolonizováno až 80% pacientů. Tato infekce se může přenášet i mezi pacienty CF, ale není přenosná na zdravého člověka. [Vávrová a kol., 1999]

Pankreatická insuficience je asociovaná s dřívější kolonizací PA. Číslo asialylovaných glykolipidů - buněčných povrchových receptorů pro PA pilin je větší u homozygotů  $\Delta F508$ . [Taccetti a kol., 1995]

*Pseudomonas aeruginosa* produkuje mnoho toxinů a faktorů virulence. Některé z nich, jako např. elastasa a alkalická proteasa interferující s faktory nespecifické (fagocytóza) a specifické imunity (NK buňky, imunoglobuliny). Toto lokální poškození imunity přispívá k chronickému rázu infekce *Pseudomonas aeruginosa*. Specifické protilátky, které stoupají v průběhu infekce mají spíše blokující charakter než aby zprostředkovávaly opsonizaci a lýzi bakterií. Protilátky tak nejsou schopny infekci eliminovat. Hlavní důvod persistence pseudomonádové infekce je schopnost bakterie produkovat mikrokolonie obsahující alginát. Alginát interferuje s chemotaxí fagocytózou a účinností antibiotik.

Počáteční kolonizace je přitom většinou zahájena nemukoidními typy PA, ale změna na mukoidní typ koreluje s rozvojem protilátkové odpovědi na antigeny a toxiny PA.

Protilátková odpověď se postupně zvyšuje v průběhu několika let. Objevují se protilátky patřící ke všem třídám IgG. Vysoké hodnoty IgG<sub>2</sub> a IgG<sub>3</sub> korelují s horším průběhem a to po spojení s imunokomplexovým chronickým zánětem v plicích, na kterém se podílí velký příliv polymorfonukleárů. [Vávrová a kol., 1999]

Chronická infekce PA je definována jako trvalá perzistence bakterie po dobu minimálně 6 měsíců nebo jako signifikantní vzestup protilátek. Charakteristickým příznakem perzistující chronické infekce PA je produkce mukoidního alginátu a tvorba mikrokolonií, které jsou špatně propustné pro antibiotika. Takzvaný mukoidní fenotyp PA je tedy spojen s horším průběhem infekce a horší prognózou. Má za následek větší rezistenci na antibiotika, ochranu před fagocytózou a komplementem. Proto je velmi důležitá prevence a včasná zachycení iniciální kolonizace PA v době, kdy bakterie ještě nebývá přítomna v mukoidní formě. Nutná je časná razantní antibiotická léčba, tak lze chronickou infekci oddálit o několik měsíců až let.

### ***Burkholderia cepacia***

Infekce tímto patogenem u CF pacientů nabývají v posledních desetiletí na významu a intenzitě. Zdrojem infekce je pravděpodobně především sekret dýchacích cest nemocných pacientů. Riziko přenosu se zvyšuje s intenzitou kašle u pacientů. Prevalence infekce BC roste s věkem. Riziko infekce ze zevního prostředí je malé, ale velké je riziko přenosu infekce navzájem mezi pacienty CF (nebo i z rukou zdravotnického personálu – mezi pacienty CF).

Hlavním úskalím infekce tímto patogenem je velká primární rezistence a snadné získání další rezistence tohoto patogenu na antibiotika. Eradikace této infekce u CF pacientů není prakticky možná.

Jsou známy různé kmeny BC, které se liší epidemiologickým a klinickým průběhem infekce. Infekce tímto patogenem může probíhat zcela asymptomaticky (buď samostatně nebo v kombinaci s infekcí PA) nebo jako progresivní zhoršování plicního onemocnění (s teplotou, úbytkem na váze a nutností opakovaných hospitalizací). Třetí forma této infekce může probíhat jako rapidní zhoršování stavu, vedoucí rychle k smrti pacienta (dokonce i u onemocnění, které dosud probíhalo mírně). Bezprostřední příčinou smrti pak obvykle bývá abscedující pneumonie a sepsa („cepacia syndrom“). [Vávrová a kol., 1999]

Protože výše zmíněné bakteriální infekce jsou často spjaty s cystickou fibrózou, bylo by zde na místě pohovořit o tomto onemocnění podrobněji:

### 3.3.2. Cystická fibróza

Cystická fibróza je autosomálně recesivním dědičným onemocněním, které se projevuje opakovanými infekcemi dýchacích cest, neprospíváním, vysokým obsahem solí v potu a u mužů neplodností.

Podstata patogenetických změn u CF je mutace CFTR genu. „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ - CFTR je chloridový kanál, lokalizovaný v apikální membráně epitelálních buněk a regulovaný cyklickým adenosinmonofosfátem. Tento kanál je u CF neprůchodný pro chloridové ionty, v důsledku čehož se mění složení a fyzikálně chemické vlastnosti hlenu na povrchu sliznic. Hlenový sekret na povrchu epitelu se zahušťuje, což narušuje normální funkci orgánů a je příčinou většiny klinických příznaků CF. Vy vývodech potních žláz nemohou být z primárního sekretu, tvořícího se v klubičku potních žláz jako ultrafiltrát plazmy, resorbovány chloridy a tedy ani natrium, a proto je v potu vysoká koncentrace solí.

Cystická fibróza je závažné onemocnění, které bylo dříve pro postižené smrtelné hned v prvních letech života, ale dnes už včasná správná diagnostika a moderní léčebné metody změnily prognózu nemoci a i kvalitu života nemocných a značně prodloužily věk, kterého se dnes běžně lidé s cystickou fibrózou dožívají. Nicméně ani toto ještě není vše, co může lékařská věda spolu s dalšími přírodními vědami pro boj s touto nemocí udělat. Jsou zde stále další cesty, které by mohly ještě více zkvalitnit život CF pacientů, prodloužit jejich dobu života anebo úplně odstranit příčinu jejich obtíží.

První historické zmínky o CF jsou známy dokonce už ze 17. století, kdy se zpívaly lidové popěvky o tom, že dítě, jehož pot chutná slaneč je očarované a tudíž brzy zemře. Později byla samozřejmě snaha o zracionálnění této zvláštní souvislosti. Proto se soudilo, že těžce nemocné děti se hodně potí a málo myjí a tímto lze vysvětlit slanosť jejich potu.

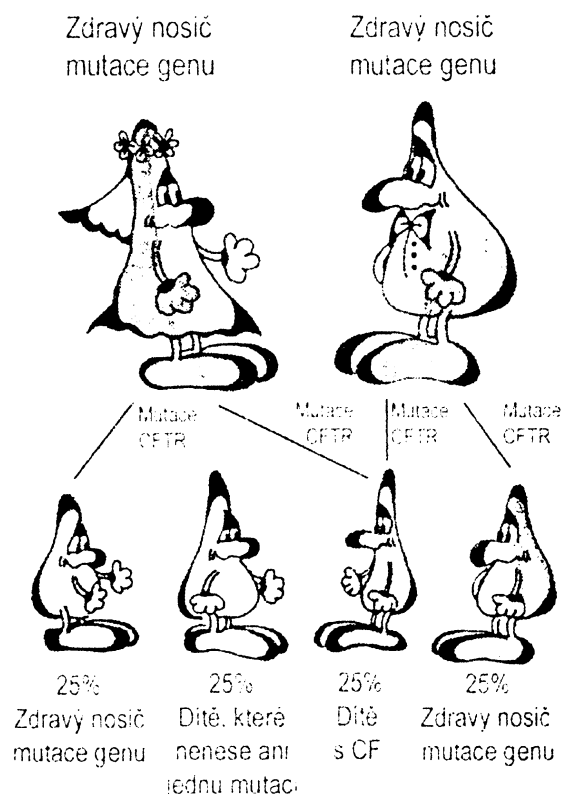
Také je pozoruhodné sledovat nejčastější typy vyskytujících se mutací na různých zeměpisných místech, v kterých se odráží historie a migrace evropských národů.

První popis cystické fibrózy je ale až z roku 1938 od americké patoložky D. Andersonové. Hodně nápomocný začal být také potní test pro včasné a dostatečně přesné diagnostikování této nemoci. Roku 1976 bylo vypracováno první komplexní léčebné schéma s nímž se i výrazně zlepšily vyhlídky nemocných. Gen CF byl odhalen roku 1989, což umožnilo poznání podstaty nemoci a také se započaly úvahy a pokusy související s genovou terapií.

Očekává se, že dnes narození nemocní mají naději dožít se kauzální léčby ať již genovou terapií, či farmakologickým ovlivněním defektního proteinu.

CF je dědičná porucha, která se vyskytuje poměrně často: Každý 25.-30. z nás může být nosičem této nemoci. Tedy je pravděpodobnost, že každé 625.-900. manželství je manželstvím, v kterém oba potencionální rodiče jsou nosiči. Statisticky připadá jedno CF dítě na každých 2 500-3 500. narozených dětí, nejvyšší frekvence výskytu CF je v evropské populaci, a to 1:2500. Již také mnohem lépe rozumíme genetice a biochemické podstatě onemocnění. Mutace CFTR genu jsou přenášeny podle Mendelových zákonů autosomálně recesivním způsobem. Pro dva rodiče-nosiče mutace tohoto genu tedy existuje 25% pravděpodobnost, že se jim narodí dítě postižené CF (to zdědí od každého rodiče právě tu alelu, na níž je přítomný zmutovaný CFTR gen), 50% pravděpodobnost, že narozené dítě bude zdravým nosičem mutace tohoto CFTR genu (ať už mutace zděděné po otci či po matce) a konečně 25% pravděpodobnost, že se jim narodí zdravé dítě, které ani nenesé žádnou mutaci CFTR genu.

[Vávrová a kol., 1999]



Obr.5. Jak se dědí mutace CFTR genu z rodičů na děti [Vávrová a kol., 2000]

Gen kódující CFTR protein se nachází na 7. chromosomu. CFTR protein je tvořen 1480 aminokyselinami, obsahuje doménu několikrát procházející membránou, několik vazných míst pro ATP a oblast transportu iontů přes membránu. [Mareš a kol., 2001]

Je známo přibližně 800 možných mutací CFTR genu.

K diagnóze CF používáme několik metod: vyšetření potním testem (normální koncentrace chloridů v potu je 10-30 mmol/l potu, u CF jsou hodnoty většinou nad 60 mmol/l), molekulárně genetické vyšetření a vyšetření transepiteliálního rozdílu potenciálů. Nejdůležitější metodou ale samozřejmě zůstává molekulárně genetické vyšetření, které může potvrdit nebo vyvrátit podezření na CF. Molekulárně genetická a prenatální diagnostika může být buď přímá (známé a přesně lokalizované mutace) nebo nepřímá (pomocí genových markerů, které se vyskytují v blízkosti mutovaného genu nebo v genu samotném). Prenatální diagnóza CF je možná už od 11. týdne gravidity a provádí se z DNA buněk plodové vody nebo z placenty. [Vávrová a kol., 1999]

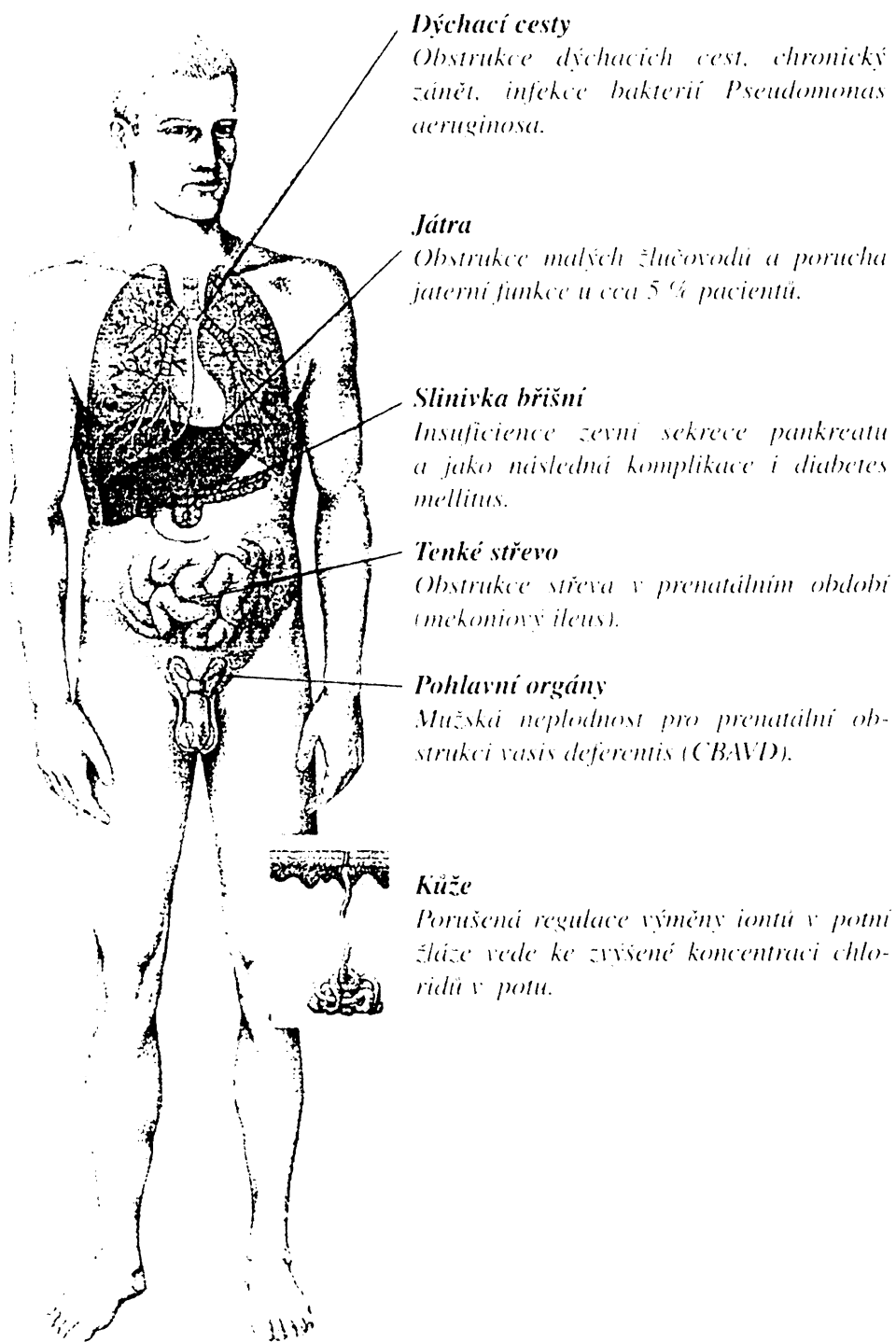


### **Příznaky upozorňující na diagnózu CF:**

První upozornění na CF může být ultrazvukové vyšetření v těhotenství nebo anamnestický dotaz při vyšetření novorozenců, jestli jejich pot chutná slaneč.

Klinické podezření je spojeno především s příznaky problémů respiračního ústrojí a gastrointestinálního traktu. V různých věkových obdobích však mohou být příznaky upozorňující na CF různé. Stručný popis hlavních příznaků spojených s CF můžeme vidět na následujícím obrázku 6.

## CYSTICKÁ FIBRÓZA V PRAXI



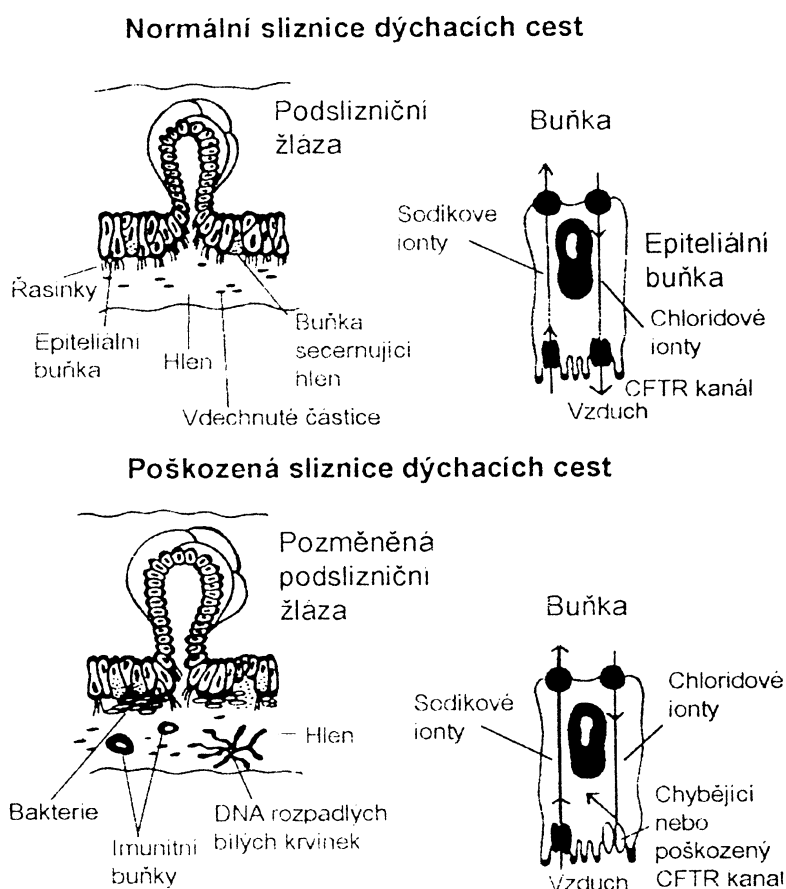
Obr.6. Projevy cystické fibrózy [Vávrová a kol., 1999]

## Patofyziologie u CF a způsoby léčení:

### **Respirační ústrojí:**

V patofyziologii plicních změn se uplatňuje základní geneticky podmíněný defekt CFTR genu. V důsledku poruch CFTR genu se zahušťuje hlen a mění jeho složení a tak periciliární tekutina na povrchu epitelu dýchacích cest je u CF isotonická a neschopná baktericidie (narozdíl od normálního hypotonického složení). Snadno zde tudíž vzniká infekce. Neutrofily v reakci na vzniklou infekci produkují proteasy a ty se přímo podílejí na destrukci plicní tkáně, vyvolávají hypersekreci hlenu a poškozují činnost řasinkového epitelu. Při progresivním plicním onemocnění se též uplatňují eosinofily, zánětlivý interleukin IL-8, volné kyslíkové radikály (snížení hladiny ochranného vitaminu E). Degradace neutrofilů způsobuje uvolňování jejich DNA a ta dále přispívá k zvýšené viskoelasticitě sekretu. [Vávrová a kol., 1999]

Na obrázku 7 je rozdíl mezi normální a poškozenou sliznicí dýchacích cest.



Obr.7. Normální a poškozená sliznice dýchacích cest s hlenotvornou podslizniční žlázou a buňkami výstelky (epitelu) – řasinkovými a sekretujícími hlen. Vedle je znázorněna buňka s normálně fungujícím chloridovým kanálem. V dolní části obrázku je sliznice dýchacích cest u CF se zbytnělou podslizniční žlázou, porušenou výstelkou, bakteriemi, imunitními buňkami a DNA z rozpadlých bílých krvinek v hlenu. V pravé části obrázku je buňka s chybějícím nebo poškozeným CFTR kanálem, který je nepropustný pro chloridy. [Vávrová a kol., 2000]

### **Plicní infekce:**

Hustý hlen u pacientů je živnou půdou pro bakterie a viry. Pacienti trpí opakovanými respiračními infekcemi jejichž přechod do chronické podoby je nejčastější příčinou úmrtí. Tyto infekce byly popsány v části týkající se patogenity PA. Kromě nejzávažnějších infekcí PA a BC se u pacientů CF ještě můžou vyskytovat infekce těmito patogeny: Především jsou to *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*. Dále se také mohou objevit *Pneumococci*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Legionella*, *Pasteurella multocida*, *Alcaligenes faecalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus* a další. Respirační viry mezi něž patří i viry chřipky mohou zvýšit vnímavost pacientů k sekundárním kolonizacím způsobených bakteriemi. [Vávrová a kol., 1999]

### **Léčba:**

Léčení respiračních onemocnění CF pacientů probíhá vlastně téměř neustále a je tedy proto časově velmi náročné. Léčebná rehabilitace sestává z respirační fyzioterapie, dechové rehabilitace a pohybových aktivit.

Pacienti denně inhalují léky na zředování hlenu. Významný je nedávný objev, pomocí něhož dochází k velmi dobrému zředění hlenu - je to inhalace rekombinantní lidské DNAsy, která štěpí DNA degradovaných polymorfonukleárů.

Infekce vyvolaná různými patogeny se léčí antibiotiky, ale bakterie PA a BC jsou na antibiotika značně rezistentní. Jestliže není infekce chronická, je ještě možná její léčba, ale jakmile se dostane do své chronické fáze - antibiotika již jen snižují aktuální počet bakterií v plicích, ale infekci neodstraní. Antibiotika se většinou podávají delší dobu nebo

opakovaně, ve větším množství a také v různých kombinacích - což je samozřejmě obrovská zátěž pro celý organismus pacienta CF.

Při velkém zhoršení funkce plic se přistupuje i k transplantaci plic, která obvykle výrazně zvýší kvalitu života pacienta. Navzdory tomu se ale pacient po transplantaci nedožívá mnoho let z důvodu agresivní imunosupresivní léčby provázené mnoha vedlejšími účinky (jako je i snadná infekce organismu). [Vávrová a kol., 1999]

### **Gastrointestinální trakt u CF:**

Insuficience exokrinní funkce pankreatu je nejběžnějším GIT symptomem CF. Pankreas je morfologicky a částečně i funkčně změněn a nemůže proto produkovat trávicí enzymy. Nejvíce je narušeno trávení tuků. Léčba spočívá v perorální dodávce pankreatických enzymů..

Dalšími potížemi mohou být: pankreatitida, diabetes mellitus vázaný na CF, gastroezofageální reflux, peptidické vředy, gastritida, mekoniový ileus, distální intestinální syndrom, invaginace, onemocnění appendixu, fibrotizující kolonopatie, prolaps rekta, jaterní onemocnění.

Dobrá výživa - vhodný a dostatečný příjem energie, je pro pacienty s CF velmi důležitý - ovlivňuje průběh jejich nemoci.

Pankreaticky insuficientní nemocní se špatným stavem výživy bývají dříve chronicky kolonizováni PA a jejich stav se zhoršuje rychleji než u pacientů s dobrým stavem výživy. Stav výživy tak do určité míry vypovídá o celkovém klinickém stavu. [Vávrová a kol., 1999]

Při zvýšeném pocení (v létě, při fyzické zátěži) je nutný větší přívod soli. Potíže také mohou být s příjmem vitamínů rozpustných v tucích - což jsou A, D, E, . Tyto vitamíny se proto většinou podávají spolu s pankreatickou substitucí, aby byla zajištěna jejich maximální absorpce.

### **Ostatní komplikace:**

- postižení potních žláz (pot obsahuje 5krát více solí, při velkém pocení proto nebezpečí hypoelektrolytémického šoku)

- postižení reprodukčního ústrojí (98% mužů, nadvarle končí slepě, chybí jeho vývod - pravděpodobně vývodné cesty ucpány hustým hlenem; někdy i ženy, v děložním hrdle vazký hlen)
- osteoporóza (horší vstřebávání vitamínu D z potravy)
- kardiomyopatie
- projevy autoimunity

[Vávrová a kol., 1999]

### **Prognóza léčení CF:**

Délka a kvalita života jedinců s CF stoupá, z důvodu stále lepších způsobů léčení. Výzkum a vývoj genové terapie pokračuje, avšak dosud není použitelná ke kauzální léčbě, to ještě nějaký čas potrvá. Proto je teď důležité co nejlépe pečovat o nemocné CF, léčit je zatím novými (a stále se zlepšujícími) dostupnými metodami, aby se dožili genové terapie v co nejlepším stavu. A tyto způsoby léčby se také dále snažit zdokonalovat a vyvíjet nové. Tím mám na mysli hlavně boj s největšími nepříteli pacientů CF, což jsou bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*.

### **3.3.3. Jiné rizikové faktory pro onemocnění *Pseudomonas aeruginosa***

PA je vážným patogenem nejen u pacientů CF, ale také u dalších ohrožených jedinců. Také u těchto různých skupin by se mohlo uvažovat o potencionální pasivní imunizaci - jestliže víme již předem o možnosti infekce PA. V některých případech - což se týká hlavně různých zranění a popálenin by mohla být pasivní imunizace použita alespoň coby podpůrná léčba. Rizikové faktory, které podstatně zvyšují pravděpodobnost stát se hostitelem PA jsou: [Cachia a kol., 2003]

- rakovina
- popáleniny
- kritický stav, pobývání na jednotkách intenzivní péče
- AIDS
- otevřená zranění
- neutropenie

- defekt imunity, imunodeficiencie
- imunosuprese (po transplantaci)
- dlouhodobé užívání antibiotik
- leukémie
- těžké operace
- diabetes mellitus
- piercing chrupavky horního ušního boltce [Keene a kol., 2004]
- nošení kontaktních čoček [Baumann a kol., 2004]

### **3.3.4. Způsobená onemocnění**

PA způsobuje celou řadu onemocnění a zdravotních komplikací. I zde by byla možnost jim zabránit či alespoň zlehčit jejich vážnost vhodným způsobem imunizace.

- endokarditida (PA infikuje srdeční chlopně; dostává se sem z krevního řečiště)
- respirační infekce (ohrožení jsou pacienti se špatným stavem dýchacích cest nebo imunity; objevují se tedy u pacientů s chronickým plicním onemocněním, u neutropenických pacientů, pacientů trpících rakovinou podstupujících chemoterapii, u pacientů CF; mukoidní kolonizace u pacientů CF)
- bakteriémie a septikémie (u pacientů se špatnou imunitou – AIDS, neutropenie, vážné popáleniny; většinou se pacienti nakazí v nemocnicích)
- infekce centrální nervové soustavy (meningitidy a mozkové abscesy; příčiny - zranění hlavy, lékařský zákrok anebo infekce v jiné části těla)
- ušní infekce a zánět vnějšího ucha (často způsobuje záněty uší u plavců; nebo při zranění, piercingu)
- oční infekce (jestliže jsou oční obranné mechanismy poškozeny, bakterie produkuje elastasu, alkalickou proteasu a exotoxin A - naruší se rohovka a infekce může vést až ke ztrátě zraku)

- infekce kostí a kloubů (většinou se rozšíří z jiného místa infekce; nebo po nějakém zranění)
- infekce vylučovacího traktu (většinou nosokomiální; může se dostat do krevního řečiště a způsobit septický šok)
- infekce gastrointestinálního traktu (může způsobovat infekce v jakékoliv části; často imunokomprimovaní jedinci; také možnost vzniku septického šoku)
- kožní infekce (dermatitidy, infekce po zranění, popáleninách; snadná nákaza u pacientů AIDS; může se vyskytovat i u zvláštních forem akné)

[<http://textbookofbacteriology.net>]

### 3.4. Terapie

#### 3.4.1. Léčba antibiotiky

Kmeny PA, které vyvolávají nosokomiální infekce jsou obvykle velmi rezistentní na antibiotika. Na léčbu PA infekcí se používá: polymyxin B, kolistin, gentamicin, ofloxacin a ciprofloxacin. [Bednář a kol., 1996] (flourochinoly, gentamicin, imipenem – [Cachia a kol., 2003].

Největší centrum v ČR, které sdružuje pacienty s CF a které se této nemoci už několik let věnuje je při Fakultní nemocnici Motol v Praze - II. dětská klinika, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol v Praze popisují léčbu takto: U nemocných infikovaných PA se doporučuje pravidelná 3-4krát ročně opakovaná čtrnáctidenní kúra, která spočívá v intravenózním podávání kombinací antibiotik. Aminoglykosidy se podávají s betalaktamy (piperacilin, ceftazidim, imipenem, aztreonam) nebo s cotrimoxazolem či chinolony. Hladiny aminoglykosidů jsou monitorovány. Pravidelné provádění této terapie se osvědčilo v dánském CF centru a je přejímáno mnoha dalšími pracovišti. Výběr antibiotika se řídí citlivostí mikroba. V posledních letech se osvědčil i ciprofloxacin podávaný perorálně - podává se v dávce 30mg/kg/den, a to i malým dětem. Inhalovaná antibiotika jsou u nemocných chronicky infikovaných PA podávána dlouhodobě, někdy i trvale. Nejčastěji se k tomuto způsobu léčby užívá Colimycin, případně aminoglykosidy nebo betalak-



tamy. V současné době se v USA zkouší tobramycin bez konzervačního prostředku ve vysokých dávkách (600 mg/3krát denně). Léčení infekcí vyvolaných multirezistentními bakteriemi je jedním z největších problémů posledních let. Je to také BC, která bývá velmi rezistentní na aminoglykosidy a je citlivá pouze na 2-4 betalaktamy. Nicméně se v léčbě doporučuje podávat kombinaci vysokých dávek aminoglykosidů s betalaktamy, protože in vivo může existovat synergismus. Za velmi důležitou je pokládána prevence infekce, poněvadž je dobře přenositelná mezi pacienty navzájem. [Vávrová a kol., 2000, B]

V dánském centru pro CF, v Kodani začali v roce 1971 s výzkumem CF - sledovali pravidelně hodnoty specifických protilátek proti PA v séru pacientů CF, kteří byli již ve stadiu chronické infekce. Zjistili, že tato protilátková odpověď úzce koreluje s průběhem nemoci a že s její pomocí mohou diagnostikovat závažnost a pokročilost infekce. Rozlišovali tak mezi občasnými, přerušovanými infekcemi a chronickou kolonizací, která je charakterizována zvýšenou protilátkovou odpovědí. Míra protilátkové odpovědi je závislá na pokročilosti zánětu a poškození tkáně. Rychle rostoucí množství protilátek a tvorba imunokomplexů a precipitátů je spojena se špatnou prognózou. [Johansen a kol., 2004] S postupně se zlepšující léčbou PA infekcí se zvyšuje i šance udržet infekci PA alespoň nějaký čas pod kontrolou.

Dle použité léčby v jednotlivých časových obdobích se postupně zvyšoval čas přežití pacientů po objevení se chronické infekce a také se prodlužoval průměrný věk počátku chronické infekce.

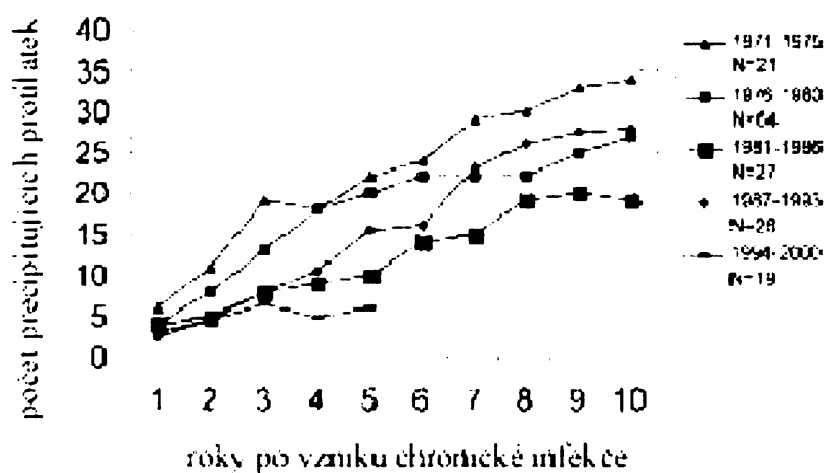
Zlepšující se léčba infekcí PA je presentována v tomto časovém vývoji:

- 1971-1975; intravenózní antibiotická terapie byla předepisována pouze u akutních plicních problémů, průměrně to bylo jedenkrát ročně
- 1976-1980; všichni pacienti s chronickou PA infekcí byli léčeni každé 3-4 měsíce po dobu 2 týdnů podáváním antibiotik intravenózní cestou
- 1981-1986; byla zavedena důsledná izolace infikovaných a neinfikovaných pacientů, zlepšení všeobecných hygienických podmínek v nemocnici bránícím vzájemnému přenosu infekcí mezi pacienty, zavedení vysoce kalorické diety
- 1987-1993; pro prevenci či odložení počátku chronické infekce byla indikována agresivní chemoterapie orálním podáváním ciprofloxacinu s kombinací s inhalací colistinu po 3 týdny kdykoliv byla PA izolována ze sputa neinfikovaného pacienta, inhalace colistinu byla předepsána všem chronicky infikovaným pacientům mezi

pravidelnou intravenózní léčbou, některým pacientům byl podáván ještě orálně ciprofloxacin, později byla počáteční agresivní terapie prodloužena až na 3 měsíce

- 1994-2000; denní inhalace rekombinantní lidské DNAsy

Dříve se každoročně u infikovaných pacientů CF objevilo 5 nových precipitujících protilátek v krvi, dnes už se toto číslo snížilo na 2,4 (v posledních 10 letech) - což indikuje lepší prognózu a delší přežívání pacientů s chronickou PA infekcí. V grafu na obrázku 8 vidíme počet protilátek v závislosti na čase od počátku chronické infekce PA. Také počátek chronické infekce se zvýšil z 11 let (později už 9,3) na 13,8 let. [Johansen a kol., 2004]



Obr.8. Průměrný počet precipitujících protilátek po vzniku chronické infekce. [Johansen a kol., 2004]

Přes všechny tyto snahy se ještě nikomu nepodařilo vyléčit chronickou infekci PA a podávání antibiotik se pouze snaží infekci zmírnit a prodloužit život pacientům. Ale vysoké dávky a dlouhodobé užívání antibiotik není příliš přínosné pro lidský organismus a je zde také nebezpečí, že si bakterie postupně na účinné léky navyknou a stanou se vůči nim rezistentní.

Proto by bylo nejlepším řešením těmto PA infekcím úplně zabránit. O to se můžeme snažit prostřednictvím imunizace rizikových skupin pacientů ohrožených touto vážnou infekcí.

### 3.4.2. Aktivní versus pasivní imunizace proti oportunním infekcím

*Pseudomonas aeruginosa* je nejčastější patogen způsobující příležitostné nosokomiální infekce. Dále jsou to ještě například *Staphylococcus aureus* a *Enterobacterie*. Tyto bakterie, které se vyskytují hojně v nemocnicích jsou často rezistentní vůči různým antibiotikům.

Příležitostné patogeny představují v dnešní době čím dál větší problém. Je to důsledkem zvyšující se rezistence bakterií na běžně užívaná antibiotika. A častý výskyt oportunních infekcí je také způsoben tím, že přibývá více jedinců, kteří mají omezenou funkci imunity chronickou či akutní chorobou nebo zraněním. [Walker a kol., 2004]

Samozřejmě na otázku zda je lepší aktivní či pasivní imunizace nelze zodpovědět nijak rezolutně a musíme uvažovat případ od případu a jeho pozadí a potom až můžeme diskutovat, kdy je vhodnější použití aktivní a kdy pasivní imunizace.

Jaké by měly být obecné předpoklady pro použití aktivní imunizace?

- musí být možné přesně určit v dostatečném časovém odstupu před možností vzniku infekce rizikové skupiny
- nalezení dostatečně imunogenního (protilátky proti němu se tvoří ve vysoké koncentraci a mají velkou afinitu) antigenu specifického pro daný organismus, který je zároveň pro lidský organismus netoxický
- riziková skupina lidí, která má být aktivně imunizovaná je schopná dostatečně velké imunitní odpovědi na podávaný antigen (či celou bakterii)

Jestliže nejsou výše zmíněné podmínky splněny tak je na místě použít spíše pasivní imunizaci, která může sloužit i jako podpůrný léčebný prostředek.

Pasivní imunizaci je vhodné použít u nosokomiálních infekcí, kdy ne vždy dostatečně předem víme, kdo bude patřit do ohrožené skupiny a tudíž použití aktivní imunizace by nebylo zde včasné a tedy ani účinné. Významnou výhodou použití protilátek k léčbě těchto

nosokomiálních infekcí místo antibiotik je, že bakterie si na protilátky nedokáže vytvořit rezistenci.

Poté je třeba se rozhodnout, použije-li se pro aktivní imunizaci nebo na produkci protilátek pro pasivní imunizaci celá bakterie či pouze její vybraná část. Dnes se již spíše častěji přiklání k druhé možnosti, kdy vznikají nám předem známé monoklonální protilátky proti vybranému epitopu, který je schopen navodit dostatečnou produkci protilátek. Vhodné je vybrat dostatečně účinný peptidový antigen.

Při výběru vhodného peptidového antigenu je třeba brát v úvahu následující obecná pravidla:

- peptid by neměl být součástí výrazné sekundární struktury ( $\alpha$  - helix,  $\beta$  - struktura), naopak vhodná jsou místa s absencí sekundární struktury
- peptid, který je co nejvíce obnažen a exponován na povrchu (aby byl snadno dostupný protilátkám)
- dostatečná antigenicita (aby byla navozena dostatečná tvorba protilátek)
- musí být jedinečný (podobná peptidová struktura samozřejmě nesmí být přítomná v těle hostitele, struktura by měla být druhově specifická)
- často je vhodný peptidový antigen nedaleko C konce proteinové sekvence

Vodítkem při výběru peptidu může být jeho schopnost kompetitivně inhibovat adhezi celé bakterie. Významnost jednotlivých aminokyselin v peptidu pak lze zjistit postupnými záměnami jednotlivých aminokyselin v peptidu a vzájemným porovnáním jejich inhibičních schopností.

#### 4. Virulenční a s virulencí spojené faktory *Pseudomonas aeruginosa*

Poznání virulenčních faktorů je důležité pro odhalení jejich úlohy při infekcích lidského organismu. Pro výběr vhodného antigenu pro pasivní či aktivní imunizaci je vhodné zvolit virulenční či adhezenční faktor a tak pomocí protilátek zabránit adhezi bakterie nebo eliminovat její škodlivé působení (např. prostřednictvím toxinů).

Zde si rozdělíme nejdůležitější faktory přispívající k virulenci bakterie:

- adherenční faktory
  - pili
  - flagella
  - exoenzym S
  - vnější membránové proteiny (OprF)
  - biofilm, extracelulární vrstva tvořena alginátem
- invaziny
  - elastasa
  - alkalická proteasa
  - fosfolipasa (hemolysin)
  - lecitinasa (hemolysin)
  - cytotoxin (leukocidin)
  - siderofory
  - pyocyanin
- toxiny
  - exoenzym S
  - exotoxin A
  - lipopolysacharid (LPS)

##### 4.1. Vybrané antigeny pro imunizaci

Tab.1. Virulenční a další faktory využívané jako antigeny pro aktivní či pasivní imunizaci

<b>antigen</b>	<b>funkce, důvod</b>
pili (fimbrie)	odpovědné z 90% za adhezi
flagella (bičík)	pohyb, adheze
LPS	bakteriální toxin, část buněčné stěny
vnější membránový protein F	porin, adheze
vnější membránový protein I	porin
elastasa	proteasa
fosfolipasa C	hemolysin
exotoxin A	bakteriální toxin, ADP – ribosylující
exoenzym S	bakteriální toxin, ADP – ribosylující
Alginát	mukoidní exopolysacharid tvořící anaerobní bio-film
ribosom	evoluční vzdálenost
DNA	evoluční vzdálenost
lektiny (LecA a LecB)	adheze, cytotoxicita

Dále si uvedeme příklady studií zacílených na prevenci infekcí PA.

#### 4.1.1. Celé bakterie

Nejjednodušším způsobem vakcinace je použít celou bakterii, potom ale nevíme přesně jaké druhy protilátek a proti jakým komponentám bakterie se vytvořily. Příklady s použitím tohoto druhu imunizace jsou uvedeny v následující tabulce 2.

Tabulka 2 Vakcinace proti PA celými buňkami [Holder, 2004]

<b>imunogen</b>	<b>testováno na</b>	<b>aktivní imunizace</b>	<b>pasivní imunizace</b>	<b>efekt imunizace</b>
Teplem zabitě celé buňky uchované ve fenolu, 1 kmen	králíci	+	+	podstatně ↑ přežití
Teplem nebo formalinem zabitě celé buňky, 1 kmen	myši bez popálenin a s popáleninami	+	-	podstatně ↑ přežití; ↓ patologické nálezy v orgánech
alkoholem precipitovaná „slizová“ frakce, 1 kmen	myši	+	+	podstatně ↑ přežití
EDTA-glycinová extrakce živých buněk, 16 serotypů, polyvalentní vakcína (PEV-01)	myši	+	+	podstatně ↑ přežití

Lepším způsobem imunizace je vybrat jen části bakterie a ty použít k aktivní imunizaci či pro tvorbu specifických protilátek. Některé příklady takovýchto pokusů, které by měly zastavit či alespoň zmírnit infekce PA jsou uvedeny dále – vždy dle použité komponenty. Pokusům, kterým byl věnován delší čas a měly zajímavé výsledky jsem se snažila věnovat více prostoru.

#### 4.1.2. Exotoxin A

Je to bakteriální toxin. Má transferázovou aktivitu, katalyzuje přenos adenosinfosfát ribózy z NAD na elongační faktor 2 a tím inhibuje proteosyntézu v buňce. Pro svou toxicitu je nevhodný k aktivní imunizaci [Holder, 2004], používají se případně jeho pozměněné formy. Protilátky proti němu vytvořené neutralizují jeho toxický účinek. Efekt imunizace byl pouze prodloužení času přežití. Vhodnější je jeho použití u konjugovaných vakcín, kdy je spojen ještě s dalšími důležitými virulenčními faktory PA (např. s částí LPS-viz následující text). [Holder, 2004]

### **4.1.3. Lipopolysacharid**

#### **Původ antigenu a důvod jeho výběru:**

LPS je součástí buněčné stěny bakterií a působí toxicky na lidský organismus. Skládá se z lipidu a rozvětvené polysacharidové části. PA produkovaný toxin A je dalším faktorem, který přispívá k celkové virulenci této bakterie. Mutanti PA deficientní v produkci toxinu A mají totiž redukovanou virulenci.

Kvůli nedostatečné známosti virulenčních faktorů a mechanismu patogeneze bakterie byly pokusy o nalezení účinné imunoterapie cíleny na známé komponenty buněčné stěny Gram-negativních bakterií, lipopolysacharidy. [Holder, 2004]

Kmeny PA, které iniciují kolonizaci jsou rozpoznávány protilátkami proti LPS. Tyto protilátky způsobují opsonizaci bakterií a napomáhají jejich fagocytaci. U pacientů CF infikovaných PA se často objevují vyšší koncentrace protilátek proti PA lipopolysacharidu. Jenže bohužel tyto protilátky, jak bylo dokázáno, jsou málo afinitní a tudíž nejsou příliš účinné a spíše škodí tím, že přispívají k navození zánětlivé reakce. Afinita IgG protilátek indukovaných vakcínou je vyšší než u protilátek indukovaných samotnou infekcí.[Lang a kol., 1995]

Samotný bakteriální LPS je toxický pro lidský organismus. Kmeny s více hydrofobním LPS jsou méně virulentní. Pro posuzování virulence daného kmenu je důležitý charakter O-polysacharidu z rozvětvené části polysacharidového konce LPS, který je dobře exprimován na povrchu bakteriální buněčné stěny a proto může sloužit pro přípravu vakcíny namísto celého toxicky působícího LPS.



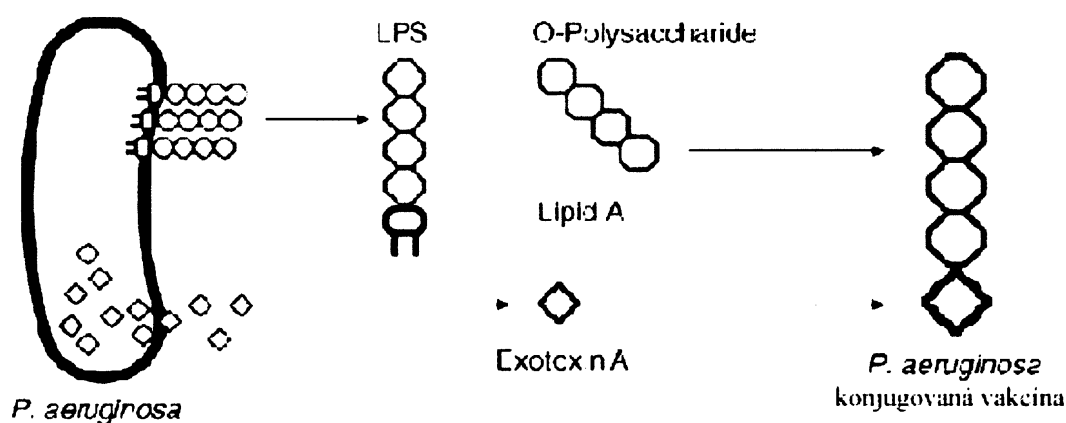
Bylo ovšem zjištěno, že různé kmeny PA mají odlišné složení LPS, a proto imunizace pouze jedním druhem LPS není účinná proti ostatním kmenům PA. Byly proto vyvíjeny polyvalentní vakcíny složené postupně z více druhů LPS (7 [Holder, 2004], 8 [Lang a kol., 2004, B], 9 (Zengzu Lai a kol., 2005]), které byly z nejvíce virulentních a nejčastěji se vyskytujících kmenů PA.

### Účinnost imunizace:

#### **Aktivní imunizace:**

Vakcinace pacientů CF proti PA oktavalentní O-polysacharid-toxin A konjugovanou vakcínou byla prováděna po dobu 10 let. Tento experiment byl ještě rozdělen na jednotlivá časová období, po jejichž uplynutí se vždy statisticky vyhodnotily získané údaje (1,5 roku, 4 roky a 10 let). Předtím byla ještě vyzkoušena bezpečnost této vakcíny podáváním zdravým dospělým.

Více než 90% infekcí PA u pacientů CF je způsobeno 8 ze 16 známých kmenů PA. Jsou to (klasifikovány dle serotypizace): IATS-1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 16. Proto byly z těchto kmenů vybrány ony vhodné O-polysacharidy, které byly poté konjugovány s pozměněným toxinem A (viz Obr.9.). Samotný toxin A je totiž stejně jak LPS toxický. [Lang a kol., 2004, A]



Obr.9. Syntéza oktavalentní anti-PA polysacharidové konjugované vakcíny. Detoxifikované O-polysacharidy 8 odlišných serotypů PA jsou jednotlivě připojeny k detoxifikovanému

exotoxinu A z PA a pak jsou stejné množství smíchány dohromady, aby vytvořily konečnou podobu oktavalentní konjugované vakcíny. [Lang a kol., 2004, A]

Do této studie byli vybráni pacienti CF, u kterých se ještě nikdy neprojevila přítomnost PA v plicích. Stejným způsobem byla vybrána i kontrolní skupina, kde byl brán ohled i na věk, pohlaví a druh mutace CFTR genu v relaci se studovanou skupinou.

Bezpečnost a imunogenenita PA oktavalentní O-polysacharid-toxin A konjugované vakcíny byla testována nejprve v průběhu jednoho a půl roku na 22 pacientech CF (v průměrném věku 7 let), kteří se ještě nikdy nesetkali s PA infekcí.

Tito pacienti byli imunizováni připravenou vakcínou. Následující přeočkování bylo pak provedeno ještě ve 2. a 12. měsíci po prvním očkování. Celý experiment trval 18 měsíců a pacienti byli během této doby pozorně sledováni a testováni, aby se zjistily případné vedlejší účinky (nebezpečnost) vakcíny. Pacientům byly také pravidelně měřeny hodnoty protilátek (množství a účinnost) anti-LPS IgG a anti-toxin A IgG. Pro toto měření se používala imunochemická metoda ELISA.

Imunizace podstatně zvýšila koncentraci IgG protilátek ke všem 9 vakcínovým antigenům. Mezi 3.-12. měsícem bylo zaznamenáno snížení koncentrace protilátek, ale stále byla tato koncentrace znatelně vyšší oproti původnímu stavu. Tělo imunizovaného pacienta produkovalo opsonizující a toxin A neutralizující protilátky ve výrazně vyšších koncentracích než tomu bylo před podáním vakcíny. Přeočkování ve 12. měsíci vedlo k rychlé a větší imunitní odpovědi organismu než byla ve 3. měsíci (proti většině antigenů - 7/9).

Vakcína byla dobře tolerována, lokální reakce (otok, bolest nebo svědění) byly převážně mírné (jako u ostatních dětských očkovaní). Všechny tyto reakce ale spontánně vymizely do 1-48 hodin po očkování. Žádné systematické reakce se neobjevily, a ani krevní obrazy očkovaných nebyly nijak pozměněné.

Žádný z pacientů nebyl během experimentu infikován či kolonizován PA. [Schaad a kol., 1991]

V dlouhodobější studii - 4 roky trvající však už výsledky tak jednoznačně pozitivní nebyly:

Experimentu se účastnilo 26 pacientů, kteří byli po podání první dávky vakcíny přeočkováni ještě v 2., 12. a 36. měsíci a během této doby byli pozorně sledováni.

Vakcína byla snášena celkem dobře. Asi 50% vakcinací bylo provázeno mírnými lokálními reakcemi - bolestí a otokem v místě injekce.

16 (61,5%) pacientů zůstalo po 4 roky bez infekce, zatímco 10 (38,5%) bylo infikováno PA. Hodnoty koncentrace protilátek proti LPS byly srovnatelné u infikovaných i neinfikovaných pacientů. Při porovnání afinitní konstanty produkovaných protilátek u jednotlivých pacientů byly již patné rozdíly - 12/16 neinfikovaných a 3/10 infikovaných pacientů prokazovalo vysoceafinitní anti-LPS protilátkovou odpověď.

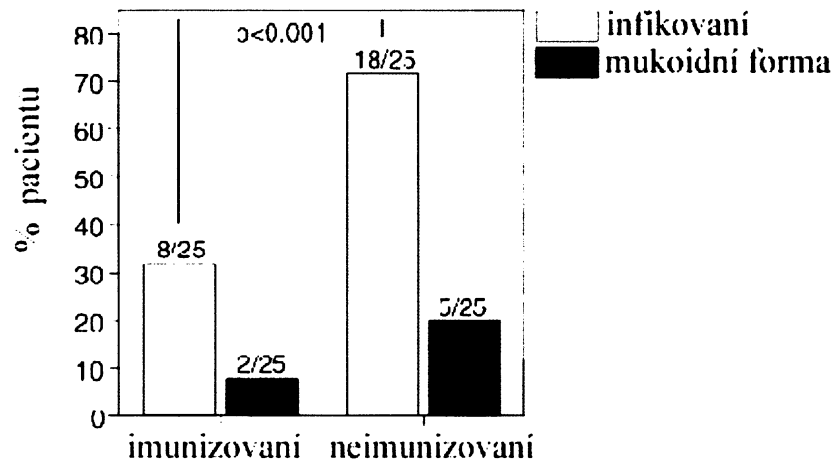
Ve srovnání s kontrolní neimunizovanou skupinou CF pacientů byl u imunizovaných pacientů v prvních dvou letech studie menší výskyt PA infekcí. Ale jen ti imunizovaní pacienti, kteří měli dostatečně afinitní protilátky měli nižší výskyt PA infekcí i během 3. a 4. roku. Naproti tomu po 2 rocích se u jedné skupiny snížila afinita protilátek a v této době byl také patrný největší nástup infekcí PA.

Protektivní vysoce afinitní anti-LPS protilátky mohou nejen interferovat s iniciačními kroky infekčního procesu, ale také mohou zabráňovat fenotypickému přepnutí bakterie z nemukoidního fenotypu do mukoidního (což se děje v pozdější fázi infekce). Přítomnost vysoceafinitních protilátek může udržet množství bakterií pod kritickou hranicí nezbytnou pro tento fenotypický „shift“, kterým se PA již většinou trvale usídí v hostiteli a kolonizuje ho.

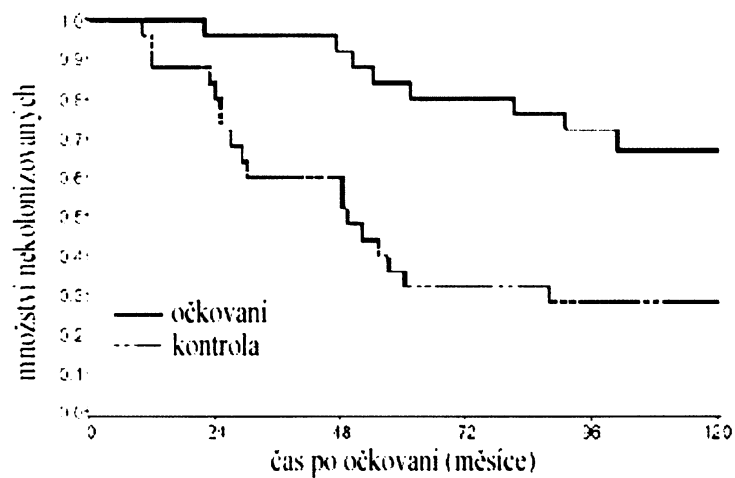
Po 4 letech tedy srovnání imunizované skupiny s kontrolní nevychází příliš pozitivně pro účinnost použité vakcíny, není zde až tak signifikantní rozdíl ve prospěch imunizované skupiny. Pokles účinných afinitních protilátek také jistě značně ovlivnila delší prodleva mezi očkováními, kdy 4. očkování bylo provedeno až 2 roky po 3. očkování. [Lang a kol., 1995]

Poté se pokračovalo v experimentu a pacienti byli od této doby přeočkováváni už každý rok.

Po 10-ti letech 8/25 (32%) imunizovaných pacientů bylo chronicky infikováno ve srovnání s 18/25 (72%) pacienty z kontrolní skupiny (viz Obr.10). Také výskyt mukoidních forem PA byl u imunizované skupiny nižší (2:5) a doba potřebná pro vznik infekce byla delší. (viz Obr.10). [Lang a kol., 2004, A]



Obr.10. PA infekce u imunizovaných a neimunizovaných CF pacientů. CF pacienti byli imunizováni ročních intervalech (až na výjimku v 3. roce) a srovnáváni s kontrolní skupinou pacientů CF. [Lang a kol.,2004, A]

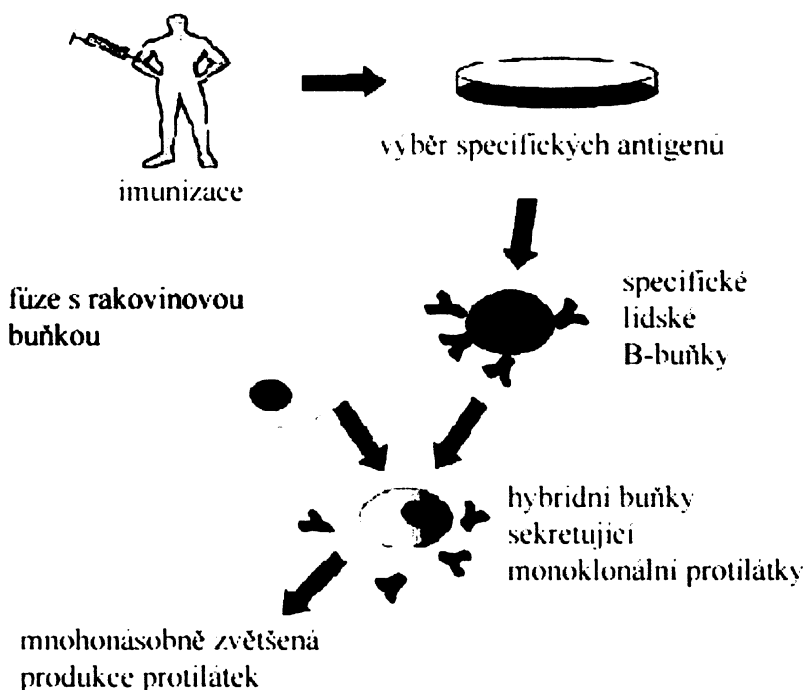


Obr.11. Užívání PA vakcíny redukuje množství CF pacientů, u kterých se vyskytne chronická infekce PA. Graf zobrazuje závislost výskytu chronické infekce PA u imunizované a kontrolní (neimunizované) skupiny pacientů CF na čase od počátku průběhu experimentu. [Lang a kol., 2004, B]

### Pasivní imunizace:

Pasivní imunizace proti PA lidskými monoklonálními protilátkami:

Monoklonální lidské protilátky jsou nejčastěji připravovány hybridomovou technologií ve stručném schématu presentovanou na obrázku 12. Použijí se lymfocyty ze zdravého dobrovolníka imunizovaného O-polysacharidovou konjugovanou vakcínou. Antigen specifické B buňky z periferní krve dají poté vzniknout lidským hybridomům. Fúzí se s myším-lidským myelomem a produkují požadované protilátky. Alternativní možností je produkce lidských protilátek rekombinantní metodou. [Lang a kol., 2004, A]



Obr.12. Produkce lidských hybridomů. Zjednodušený obrázek představující proces jejich vytváření. [Lang a kol., 2004, A]

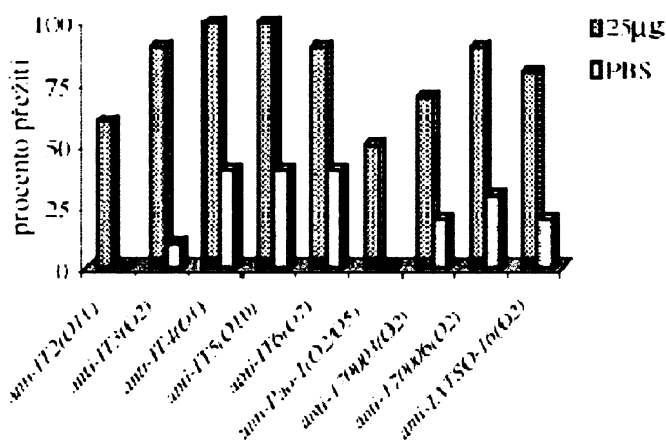
Lidské protilátky je však obtížné a nákladné připravit a izolovat z několika donorů. Tyto protilátky jsou často IgM. IgM špatně vstupují do plicní tkáně a také ve velké míře vytvářejí imunokomplexy, které zvyšují zánět a tím poškozují tkáň.

XenoMouse<sup>®</sup> je myš, která je schopna produkce monoklonálních lidských protilátek proti PA. Gen pro její imunoglobuliny je inaktivován a nahrazen částí genu kódujícího lidské imunoglobuliny (pomocí umělého kvasinkového chromosomu). Tato myš je intraperitoneálně očkovaná  $10^7$  teplem zabitých PA (směs 9 nejinfekčnějších serotypů). Myším,

které po 4-6 týdnech mají dostatečně protilátek proti PA (zjištěno z jejich krve - metodou ELISA) jsou intravenózně podány mrtvé PA a pak se z nich vytvoří hybridomy dále produkující protilátky proti PA LPS. [Zengzu Lai a kol., 2005]

Získané lidské protilátky (IgG2) z těchto transgenních myší se váží na O-postranní řetězec LPS devíti kmenů PA. Protilátky působí proti bakterii většinou opsonizací a umožní pak následnou fagocytózu. Zajímavé ovšem je, že protilátka proti sérotypu It-5 PA neopsonizovala a přesto se vázala na O-postranní řetězec LPS a zabraňovala bakteriální sepsi.

Účinnost těchto protilátek byla vyzkoušena na neutropenických myších. Kontrolní myši po podání PA většinou do 48 h zemřely. Oproti tomu myši, kterým byly ještě podány protilátky měly značně menší mortalitu (viz Obr.13.). [Zengzu Lai a kol., 2005] Další výzkum a experimenty s lidmi by byly ještě třeba pro posouzení bezpečnosti a účinnosti takto připravených protilátek



Obr.13. Protektivita lidských monoklonálních protilátek v modelu PA sepse u neutropenických myších. Myši dostaly peritoneálně dávku PA poté co 2 hodiny předtím obdržely peritoneálně buď dávku protilátek nebo roztok soli. Na ose x je serotyp PA a na ose y procento myší, které přežily 7 dní. [Zengzu Lai a kol., 2005]

Další pokusy s použitím LPS jsou stručně shrnuty v následující tabulce 3.

Tabulka 3 Vakcinace s LPS [Holder, 2004]

imunogen	testováno na	aktivní imunizace	pasivní imunizace	efekt imunizace
LPS připravené ze 7 O serotypů, kombinované kmeny tvoří 7valentní vakcínu-Pseudogen <sup>®</sup>	pacienti s popáleninami	+	+	↑ přežití
7valentní LPS vakcína, Pseudogen <sup>®</sup>	pacienti s rakovinou	+	-	podstatné, ale omezené ↓ fatální infekce; velký výskyt nežádoucích vedlejších účinků
7valentní LPS vakcína, Pseudogen <sup>®</sup>	pacienti s akutní leukémií	+	-	nebyla pozorována žádná kontrola infekce
7valentní LPS vakcína, Pseudogen <sup>®</sup>	pacienti s akutní leukémií a cystickou fibrózou	+	-	leukémie: snad menší výskyt infekcí; CF: žádný klinický benefit navzdory velkému množství protilátek
Pseudogen <sup>®</sup> a PEV-01	pacienti s popáleninami; akutní pneumonie-morčata	+	+	↓ bakteriémie; značná ochrana-obě vakcíny

Protektivita pacientů po imunizování pomocí LPS se ovšem nezdá dostačující. Infekce se vyskytují stále, i když jejich průběh je alespoň zpočátku mírnější a chronická infekce PA se u pacientů rozvine v pozdějším věku. Proto je třeba hledat vhodnější části bakterie pro imunizaci než je LPS – který také může působit toxicky.

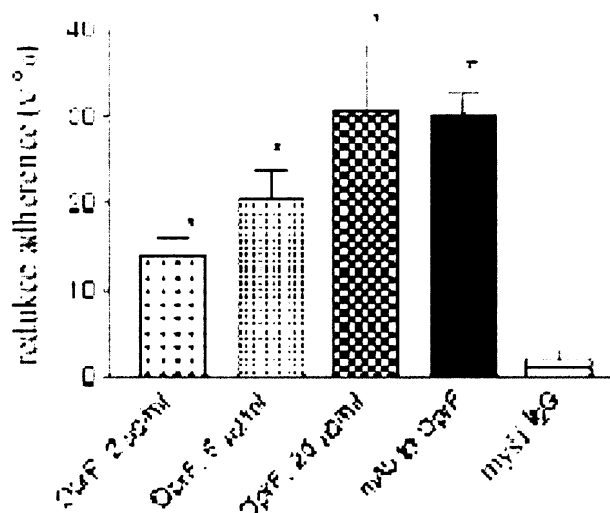
#### 4.1.4. Vnější membránové proteiny (především OprF)

### Původ antigenu a důvod jeho výběru:

Vnější membránové proteiny jsou exponovány na buněčném povrchu PA [Holder, 2004], proto jsou to dobře dostupné cíle pro protilátky. Tyto proteiny často fungují jako poriny, přispívají k membránové integritě a mohou přenášet různé substráty. Některé tyto poriny mohou být pro lidský organismus v určité koncentraci i toxické [Azghani a kol., 2002].

Mezi nimi je asi nejvýznamnějším vnější membránový protein F, který je u různých serotypů velmi konzervovaný [Holder, 2004] a má velkou antigenní kapacitu (Azghani, 2002). Imunizace vnějšími membránovými proteiny je příčinou tvorby velkého množství dlouho žijících protilátek a zdá se být také dobře tolerována. [Holder, 2004]

Mutantní kmen PA bez OprF oproti kmenu PA s OprF prokazoval podstatně sníženou schopnost adherence (až o 43%) na lidské epitelální buňky. Bakterie také prokázala sníženou schopnost adherence na buňky předem ošetřené OprF nebo monoklonálními protilátkami (mAb) proti OprF. Tyto výsledky shrnuté na obrázku 14 dokazují, že protein OprF hraje svou roli v procesu bakteriální adherence. [Azghani a kol., 2002]



Obr.14. Redukovaná adherence PA na epitelální lidské buňky po inkubaci buněk s purifikovaným OprF. Myši irelevantní IgG byly použity pro kontrolu. [Azghani a kol., 2002]



OprF možná má svůj úkol i ve formaci anaerobního biofilmu, protože některé experimenty prokazují v tomto stavu jeho zvýšenou expresi. Také protilátky proti OprF stoupnou u CF pacientů až po přechodu infekce do chronické fáze. [Yoon a kol., 2002]

Díky všem těmto vlastnostem OprF a dalších membránových proteinů není divu, že zájem o použití vnějších membránových proteinů pro imunizaci stále přetrvává a některé druhy vakcín jsou již ve II. fázi klinických studií

### **Účinnost imunizace:**

Pro aktivní imunizaci OprF jsou voleny různé strategie:

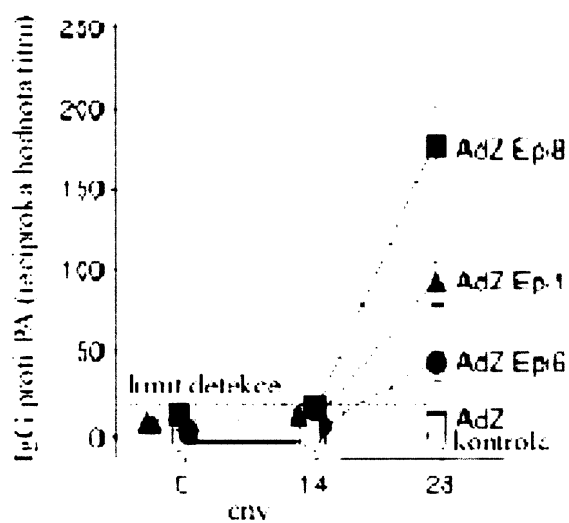
- genetická imunizace
- imunizace oslabenou *Salmonellou*
- imunizace oslabeným Adenovirem
- imunizace OprF produkovaném rekombinantní technologií

Genetická imunizace pomocí plasmidového vektoru s vloženým genem pro OprF byla testována na modelu chronické plicní infekce PA u myši. Po třech imunizacích byla zjištěna zvýšená produkce IgG1 protilátek a značná redukce počtu bakterií v plicích. Tato metoda ovšem potřebuje ještě další vývoj, aby mohla být použita u lidí. [Price a kol., 2001]

Oslabená *Salmonella* exprimující cizorodé antigeny je slibným kandidátem na vývoj vakcíny. Strategie této vakcinace spočívá ve schopnosti *Salmonelly* přetrvávat v APC během jejich migrace do lymfoidních orgánů imunitního systému. V těchto buňkách může být daný antigen zpracován a prezentován primárním T a B buňkám, které po setkání s ním započnou svoji imunitní odpověď. Tento způsob imunizace byl testován na myších modelech a prokázal značný vzestup protilátek. [Arnold a kol., 2004]

Byly prováděny pokusy s Adenovirem, který obsahoval ve své kapsidě některé epitopy OprF mající účinek na B buňky. Nejvíce imunogenní protein hexon z kapsidového obalu byl modifikován aby obsahoval vybraný epitop OprF (genová inserce epitopu do jedné z externích smyček hexonu). Adenovirus infikuje dendritické buňky jejichž úlohou je prezentovat antigeny naivním T a B buňkám. Adenovirus tedy zde působí jako adjuvant (pomocná látka zvyšující účinek antigenu). Tato imunizace pomocí Adenoviru u myši vzbudila vzestup IgG (viz Obr.15.) a také značně zvýšila šance na jejich přežití, ale imuni-

zace samotným epitopem na takovou imunitní odpověď nestačila (viz Obr.16.). [Worgall a kol., 2005]



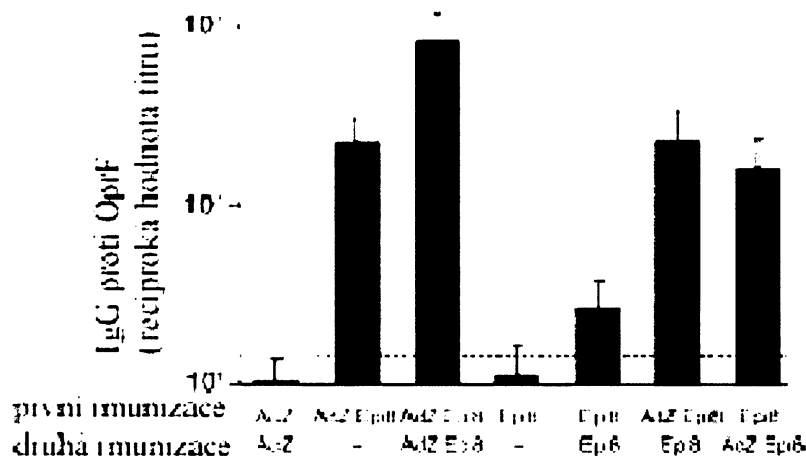
Obr.15. Imunitní odpověď u myši na PA po imunizaci Adenovirem se zabudovanými epitopy OprF v kapsidě (AdZEpi). Jako kontrola byly použity neimunizované myši a myši imunizované Adenovirem (AdZ) bez vloženého OprF epitopu (kontrola). [Worgall a kol., 2005]

Použité **epitopy** (AK sekvence):

Epi1 QYGLEKRDNGHQGE

Epi6 TDAYNQKLSERRAN

Epi8 NATAEGRAINRRVE

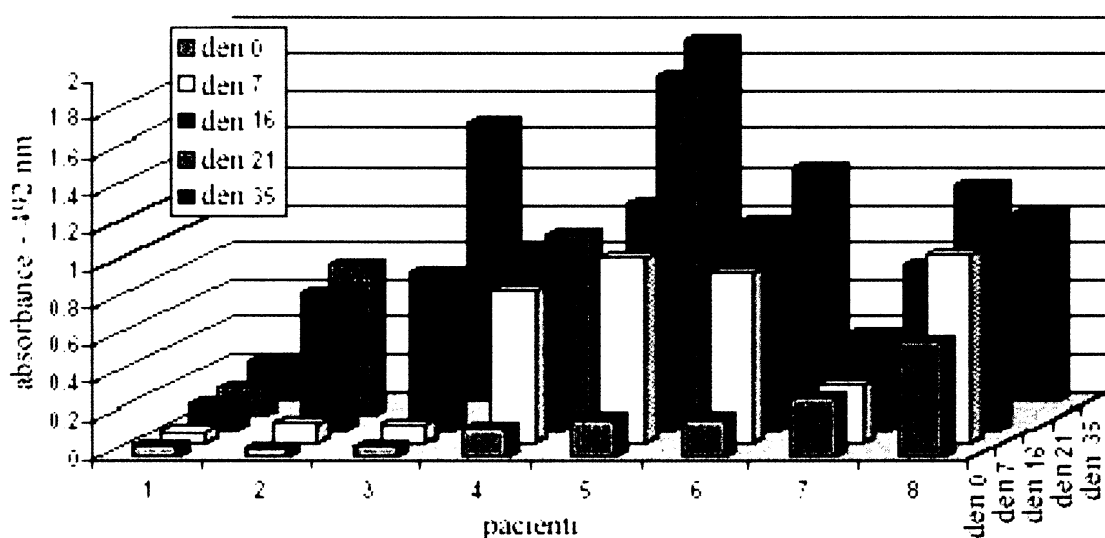


Obr.16. Myši byly imunizovány vždy po 2 týdnech a za 4 týdny byly změřeno množství specifických IgG. AdZ je Adenovirus bez OprF epitopu, Epi8 znamená imunizaci samotným epitopem 8. [Worgall a kol., 2005]

Produkce OprF rekombinantní DNA technologií má výhodu v tom, že na rozdíl od izolace a purifikace OprF se nemusíme obávat kontaminace toxickým LPS. Pro tento pokus byl vytvořen hybridní protein OprF-OprI, který obsahuje důležité epitopy z obou proteinů (Met-Ala-(His)<sub>6</sub>OprF<sub>190-342</sub>-OprI<sub>21-83</sub>). Tento protein byl základem pro přípravu dvou vakcín. První vakcína ve formě gelu (protein byl adsorbován na Al(OH)<sub>3</sub>) byla určena pacientům s popáleninami a druhá vakcína pro nosní inhalaci (směs proteinu s SDS a aerosolem) byla určena pacientům s infekcí plic – tedy především pacientům CF. Protein byl připraven v *E. coli* a poté purifikován.

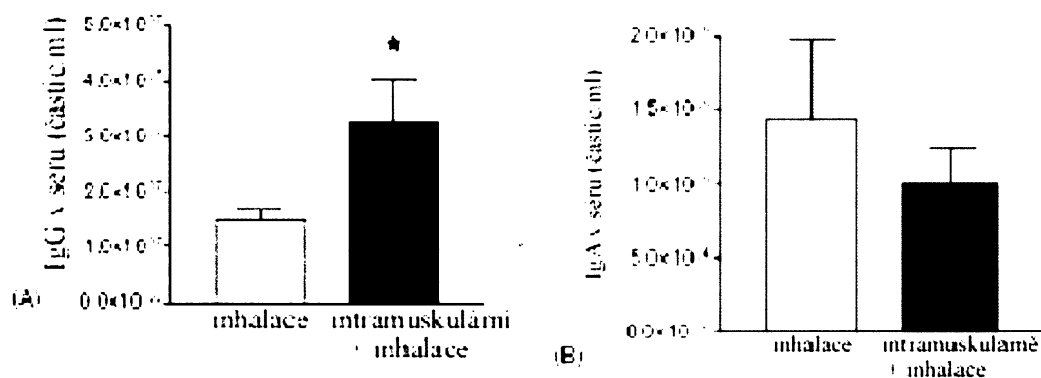
Po aplikaci tohoto proteinu krysám se u nich neobjevily žádné vedlejší účinky, proto byla započata I. fáze klinické studie. 32 zdravých dobrovolníků bylo intramuskulárně třikrát imunizováno. Po imunizaci se zvýšilo množství IgG1 protilátek dle dávky užití pro imunizaci. U 73 % jedinců se zvýšila schopnost opsonizovat a fagocytovat PA.

Na 8 pacientech s popáleninami byla poté vyzkoušena účinnost vakcíny. Vakcinace byla dobře tolerována, nevyskytly se žádné vážné vedlejší účinky. Na obrázku 17 lze vidět, že 7/8 pacientů po imunizaci prokázalo větší množství specifických protilátek proti PA (3krát vyšší titr – reciproká hodnota). Žádný z pacientů netrpěl během nebo po imunizaci infekcí PA. [Baumann a kol., 2004]



Obr.17. Specifické protilátky proti OprF-OprI v séru pacientů s popáleninami detekovaných metodou ELISA. Pacienti byli 3krát imunizováni intramuskulárně ve dnech 0, 7 a 21. [Baumann a kol., 2004]

Nosní inhalace (u jedné skupiny kombinována s intramuskulární imunizací) byla nejprve testována na 20 zdravých dobrovolnících. Po imunizaci se objevily občas mírné lokální reakce ( pálení, svědění v nose, napětí ve svalu), někdy i mírná horečka. Po imunizaci byl patrný vzestup protilátek IgG a IgA (viz Obr.18.). [Baumann a kol., 2004]



Obr.18. Vzestup protilátek proti OprF-OprI v séru. Srovnání 2 schémat imunizace: 3 inhalace nebo 1 intramuskulární dávka a 2 inhalace. [Baumann a kol., 2004]

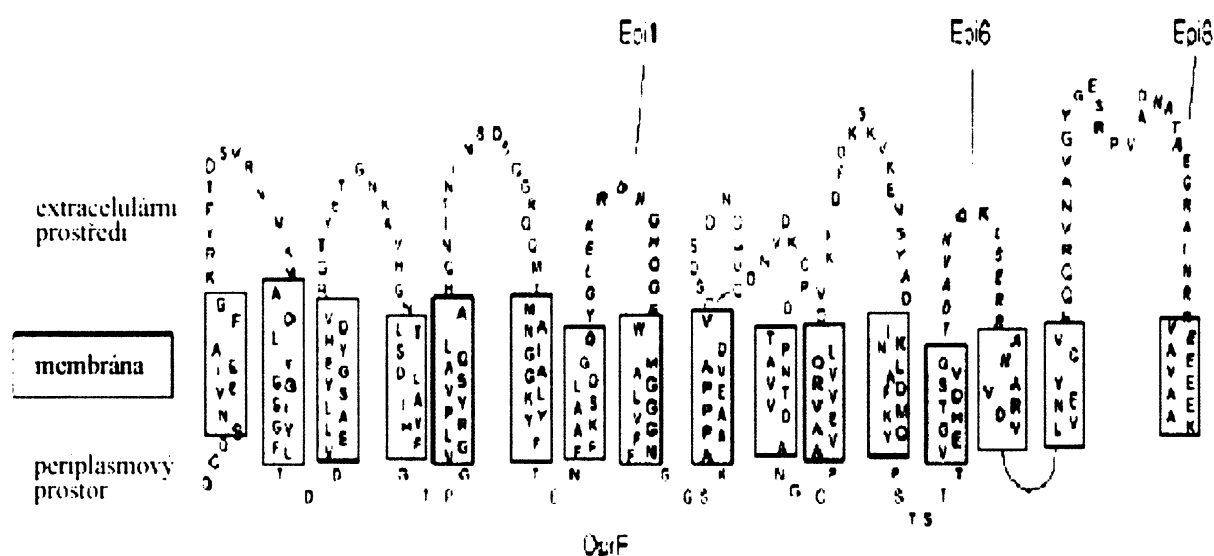
Na vývoji této vakcíny se dále pracuje. [Baumann a kol., 2004] Některé další provedené pokusy s těmito proteiny jsou ke shlednutí v tabulce 4.

Tabulka 4 Použití vnějších membránových proteinů na imunizaci. (A – aktivní imunizace, P – pasivní imunizace) [Holder, 2004]

<b>imunogen</b>	<b>efekt imunizace</b>
protein F (A,P)	3násobné ↑ LD <sub>50</sub> (myši)
monoklonální protilátky proti proteinu F (P)	2 až 3násobné ↑ LD <sub>50</sub> (myši)
proteiny F a H (A)	podstatně ↑ přežití s proteinem F, ale ne s proteinem H (opařené myši)
proteiny F, H <sub>2</sub> a I –směs (A)	2 až 26násobné ↑ LD <sub>50</sub> s odlišnými kmeny PA, 30-60 % odlišnost odpovědi na imunizaci (myši)
lipoprotein I (A)	4 až 5násobné ↑ LD <sub>50</sub> (myši)
protein F (A)	podstatné ↓ vážných plicních lézí (model chronické plicní infekce, krysy)
rekombinantní fúzané proteiny F a I (A, P)	podstatné zvýšení ↑ LD <sub>50</sub> (imunosupresivní myši)
syntetické peptidy proteinu F (A)	podstatné ↑ přežití u 2/3 testovaných peptidů - intranasální imunizace (model akutní pneumonie, myši)
protein I: exprimovaný v <i>E. coli</i> (A)	imunizace dobře tolerována; podstatné ↑ titrů; dlouho žijící (lidé – dobrovolníci)
protein F – protein I hybrid (A)	podstatný ↑ protilátek; množství protilátek stále měřitelné 6 měsíců po poslední vakcinaci; dobře tolerované (lidé – dobrovolníci)

směs OMPs (P)	afinitně purifikované protilátky z lidských IgG; protilátky ze séra pacientů s popáleninami; obě ↑ opsonizaci a fagocytózu; ↑ LD <sub>50</sub> (myši) pasivní podávání IgG
směs OMPs (A – lidé, P – myši)	fáze I klinické studie – zdraví dobrovolníci muži; podstatné ↑ specifických protilátek proti OMPs; ↑ protekce u normálních a popálených myší
protein F – protein I hybrid exprimovaný v <i>E. coli</i> (A, P)	↑ protekce při aktivní i pasivní imunizaci (myši )
směs OMPs (A – lidé, P – myši)	aktivní imunizace pacientů s popáleninami – jejich sérum prokazovalo ↑ opsonofagocytující aktivitu; ↑ přežití u myší
směs OMPs (pacienti s popáleninami)	testovací schéma: 1 mg v 3 denních intervalech se prokázalo bezpečnost a efektivitu v ochraně proti bakteriémii

OprF se prokázal jako dostatečně imunogenní u laboratorních zvířat i lidí. Jeho sekvence znázorněná na obrázku 19 napovídá, že má ve své struktuře několik extracelulárních smyček, které mohou sloužit dobře jako epitopy B buněk. [Worgall a kol., 2005]



Obr.19. Schéma struktury vnějšího membránového proteinu F pocházejícího z PA. Zvýrazněné epitopy byly použité v experimentech s Adenovirem. [Worgall a kol., 2005]

Z těchto znázorněných smyček lze vybrat peptidové antigeny, které by bylo vhodné použít při přípravě vakcíny pro pasivní imunizaci. Vybrané sekvence epitopů jsou označeny barevně v celé aminokyselinové sekvenci OprF (viz Sekvence 1). Jak již bylo zmíněno tyto epitopy byly použity již v jiných experimentech. Jako nejúčinnější se jevil epitop 8, pak epitop 1 a méně pak epitop 6 [Worgall a kol., 2005]. Také hybridní protein OprF-OprI obsahuje sekvenci OprF 190-342, která je tvořena mimo jiné epitopy 6 a 8 [Baumann a kol., 2004].

**Sekvence 1: Aminokyselinová sekvence proteinu OprF s vyznačenými epitopy (postupně 1, 6, 8), [Worgall a kol., 2005], [www.pseudomonas.com]**

MKLKNTLGVVIGSLVAASAMNAFAQGQNSVEIEAFGKRYFTDSVRN  
MKNADLYGGSIGYFLTDDVELALSYGEYHDVRGTYETGNKKVHGNNL  
TSLDAIYHFGTPGVGLRPYVSAGLAHQNITNINSQGRQQMTMANIG  
AGLKYYFTENFFAKASLDG ██████████ WMAGLGVGFNF  
GGSKAAPAPEPVADVCSDDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDANGCP  
AVAEVVRVQLDVKFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQYPSTSTTVE  
GHTDSVG ██████████ AVRDLVNEYGVEGGRVNAVGYGE  
SRPVAD ██████████ AEVEAEAK

#### 4.1.5. Flagella (bičík)

##### **Původ antigenu a důvod jeho výběru:**

Bičík slouží bakterii k pohybu a chemotaxi (viz Obr.20.). Mutanti bez bičíku prokázali značně redukovanou schopnost tvorby bakteriálního biofilmu za aerobních či anaerob-

ních podmínek [Yoon a kol., 2002]. Bičík je odpovědný i za adherenci bakterie a je také virulenčním faktorem bakterie.

Je to velmi komplexní struktura (přes 50 genů je zapojeno v syntéze a funkci bičíku), což indikuje, že se jedná o důležitou strukturu nezbytnou pro úspěšný život bakterie. Protilátky proti bičíku mají v pokusech značný protektivní účinek. Mutanti mají až 78 % sníženou schopnost adherence, mutanti postrádající kromě bičíku zároveň i pili dokonce 95 % redukci adherence. [Feldman a kol., 1998]

Roli bičíku v procesu bakteriální infekce můžeme rozdělit do 3 fází [Feldman a kol., 1998]:

- pohyb a chemotaxe pomocí bičíku na místo určení (většinou po vdechnutí do plic)
- adherence na glykolipidy epiteliálních buněk - bičík je adhesinem, ale bohužel po navázání také spouští imunitní signalizační kaskádu chemokinů IL-8, které přilákají PMN a makrofágy – čímž se dochází k zánětlivé odpovědi; PA je potom fagocytována za účasti bičíku jako ligandu
- chronická infekce při níž jsou většinou selektivním tlakem preferovány mutantní bakterie bez bičíku přeživší fagocytózu

Je to velmi konzervovaná struktura mezi kmeny PA – existují snad jen 2 druhy bičíků které mají odlišné imunogenní struktury. [Holder, 2004]

Dle strukturních analýz byly určeny dva typy bičíku [Feldman a kol., 1998]:

- typ a, heterogenní s molekulovou hmotností 45-52 kDa (za heterogenitu a různou velikost jsou mimo jiné odpovědné glykosylace flagellinu)
- typ b, homogenní s molekulovou hmotností 53 kDa





Obr.20. Snímek z elektronového mikroskopu, izolované bičíky [Ansorg a kol., 1984]

Glykosylace bičíku se zdá být důležitým dějem, protože mutanti bez glykosylace jsou méně virulentní. Pravděpodobně nějakým způsobem zvyšuje zánětlivou odpověď vyvolanou bičíkem. [Arora a kol., 2005] Sacharidové komponenty ovšem netvoří epitopy bičíku [Brimor a kol., 1998].

Díky virulenčním a adhezenčním vlastnostem a také pro svou značnou konzervovanost mezi kmeny PA je bičík vhodným adeptem pro vývoj imunizačních vakcín.

### **Účinnost imunizace:**

Byly prováděny různé testy na potvrzení virulence bičíku. Jeden z testů prokázal, že letální dávka mutantů bez bičíku musí být asi  $10^4$  vyšší než u normálních bakterií PA.

Testy byly prováděny na myších s popáleninami. Myši byly imunizovány aktivně celým bičíkem nebo pasivně králičími protilátkami proti bičíku. Oba typy imunizace se projevily jako dostatečně účinné. Monoklonální specifické protilátky proti oběma typům flagelly zabezpečují ochranu proti letální dávce PA. Myši imunizované monoklonálními protilátkami proti bičíku dostaly po 1 až 2 hodinách desetkrát vyšší  $LD_{50}$ . Imunizované

myši přežily na rozdíl od kontrolní neimunizované skupiny, kde jich přežilo pouhých 20 %. [Rosok a kol., 1990]

Další pokusy prováděné s bičíky jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5. Užití flagelly nebo pili pro imunizaci. (A – aktivní imunizace, P – pasivní imunizace) [Holder, 2004]

<b>imunogen</b>	<b>efekt imunizace</b>
purifikovaná flagella (A)	↑ přežití dle specifického flagelárního antigenu; rovnoměrně ↑ přežití při použití divalentní imunizace (myši s popáleninami)
částečně purifikovaná flagella (A)	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle
velmi purifikovaná flagella (A, P); (myši s popáleninami nebo opařené)	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle; ↑ přežití dle specifického flagelárního antigenu
pili (A)	↑ přežití specifické dle použitého kmenu z kterého byly pili izolovány (opařené krysy)
monoklonální protilátky proti částečně purifikované flagelle	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle; ↑ přežití dle specifického flagelárního antigenu (myši s popáleninami)

Pro navázání bičíku na mucin je nezbytný protein ze špičky bičíku, produkt fliD genu. Je to velmi dobře exponovaná struktura a proto je velmi pravděpodobné, že se na ní nachází nějaké epitopy. Gen fliD se vyskytuje spolu s fliC (gen kódující hlavní protein bičíku – flagellin) ve dvou odlišných typech a, b. Protilátky proti A,B typům proteinu fliD reagovaly se všemi kmeny PA, z čehož vyplývá, že tyto 2 druhy proteinu jsou mezi PA velmi konzervované. [Arora a kol., 2000]

Na tomto dobře exponovaném antigenním proteinu by proto bylo vhodné najít účinné epitopy nebo ho použít celý pro aktivní imunizaci a následnou přípravu protilátek pro pasivní imunizaci. Strukturní model tohoto proteinu v databázích není, nejbližším proteinem program vyhodnotil flagelární protein ze *Salmonella typhimurum* (~ 20 % identita, ~ 50 % podobnost). To dokazuje, jak si jsou flagelly různých bakterií velmi blízké. Nechal jsem si proto programem PBIL predikovat sekundární strukturu nalezené sekvence proteinu fliD – typ B. Oblast 195–221 v AK sekvenci proteinu se jeví jako nejdelší úsek bez sekundární struktury. Program ProtScale dále poskytl tyto výsledky: největší antigenicita kolem místa 205-225 v AK sekvenci proteinu, přístupnost kolem místa 200, málo zanořená část kolem místa 190-210 a náhodné smyčky kolem míst 200 a 220 AK sekvence proteinu. Na základě těchto údajů lze předpokládat, že vhodný epitop by se mohl vyskytovat v oblasti 195-210 AK sekvence. Aminokyselinová sekvence tohoto proteinu včetně predikovaného antigenního místa je uvedena dále v Sekvenci 2. Protože program PBIL na vyhodnocování sekundární struktury u proteinu fliD – typ A navrhl podobně rozvržený výskyt sekundárních struktur jako u proteinu fliD – typ B, lze i zde předpokládat možnost výskytu antigenního místa v oblasti 195-210 AK sekvence proteinu (viz Sekvence 3).

**Sekvence 2: Aminokyselinová sekvence fliD (typ B) a vybraný epitop,**  
[[www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)]

MAGISIGVGSTDYTDLVNKMVNLEGAAKTNQLATLEKTTTTRLTALG  
QFKSAISAFQTALTALNSNAVFMARTAKSSNEDILKASATQSAVAGTY  
QIQVNSLATSSKIALQAIADPANAKFNSGTLNISVGDTKLPITVDSSN  
NTLAGMRDAINQAGKEAGVSATIITDNSGSRLVLSSTKTGDGKDIKVE  
VSDDGGGGGPIIIIPATAPKLSDGAAAGYVTKAANGEITVDG  
LKRSIASNSVSDVIDGVSFVDKAVTEAGKPITLTVSRDDAGVKDNVKK  
FVEAYNTLTKFINEQTVVTKVGEDKNPVTGALLGDASVRALVNTMRS  
ELIASNENGSVRNLAALGITTTKDGTLEIDEKKLDKAISADFEQVASYF  
TGDTGLAKRLGDKMKPYTDAQGILDQRTTTLQKTLNVDQKADLA  
KRLAALQEKLTQFNLLSAMQDEMTKRQKSITDNLASLPYGSGKKT

### **Sekvence 3: Aminokyselinová sekvence fliD (typ A) a vybraný epitop, [program PBIL]**

MANSTTINGYNSGLDIKNIVSTLVAAEKAPKEAQLKRLESDTTAKFTG  
IGQLKSAISDLQTIKELNKPFLFQKRSASTSDEKFATATATKDALPGIY  
KLEVTQLASVSKVATASFADGYKTTSGGTLTIKQGADDAGVTVNVA  
AGATLAEVRDSLNAQLKDKGITANIVNNPGDGTSRLVFTGKDSGAGK  
DVFVQGGSGTAKRLSSTGADGKLTLSQLDGTSSSSSGYITQAKNAK  
FSIDGLTLESPTNTVVDKVIINGVTFELKTVTDTNKPITISVEQDRGGVKD  
NIKKFVAAYNKLVGVTSELTGVTKVGDDKAPVVGALVGDSSVRNLL  
TTMRNEMVQPGQGT DVRMLADMGITTKKDGTLEIDDKKLDKVLKD  
KFESVSALFTGDTGLMKRLDDKLTPYTQTGGVLQQRLDGLQDTIKSV  
DTQREALNRRVEQLQDRLLKQFTAMDQLIGQLNQTSGRMAQALSSLP  
GLVKKS

#### **4.1.6. Pili (fimbrie)**

##### **Původ antigenu a důvod jeho výběru:**

Pili jsou krátká vlákna na povrchu bakterie uplatňující ze zvláště jako adhesiny.

Bakterie s bičíkem a pili mají desetkrát nižší LD<sub>50</sub> než jejich formy bez těchto povrchových struktur. Mutanti bez pili ztrácí svou schopnost adherence in vitro. Protilátky proti pili také zastavují bakteriální adherenci na buňky. Vazebná doména pro receptory je na C-konci proteinu pilinu. [Holder, 2004]

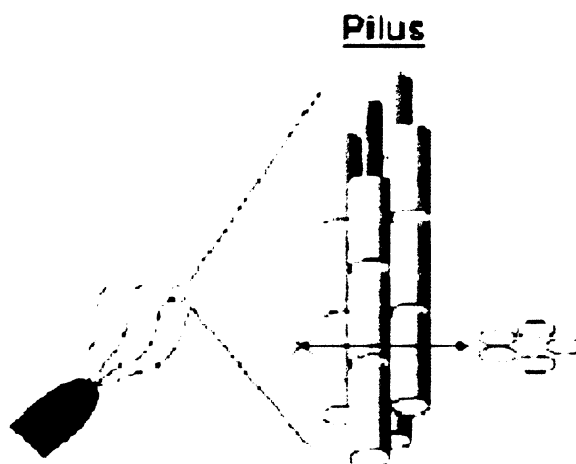
Pili jsou odpovědné za pohyb a také slouží jako receptory pro některé bakteriofágy, kteří se na ně specificky váží. [Hahn, 1997]

##### **Účinnost imunizace a pokusy zaměřené na adhezenční schopnost pili:**

Na opařených krysách byla vyzkoušena aktivní imunizace. Výsledkem bylo dostatečně zvýšený podíl krys, které přežily setkání s PA. Účinnost závisela na druhu použitého pili a kmene bakterie (viz Tab. 5.). [Holder, 2004]

Dle testů in vitro jsou bakterie PA schopné se vázat v množství až 50-70 bakterií na jednu buňku lidského plicního epitelu. Mutanti bez pili v tomto testu však projeví sníženou adhezi, pouze 4-6 bakterií na jednu buňku. Z těchto dat lze usoudit odpovědnost pili až za 90% adherence. [Hahn, 1997]

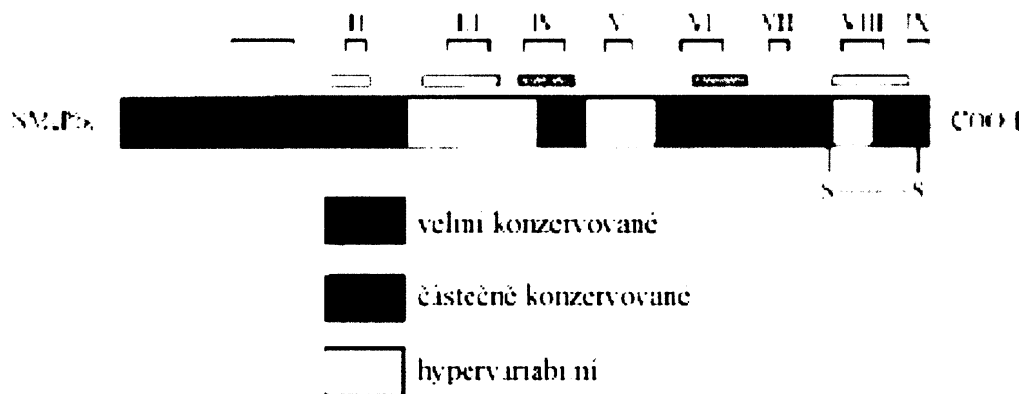
Typ pilusu IV je homopolymer skládající se z několik tisíc kopií pilinu – proteinové podjednotky o velikosti 15kD (viz Obr.21.). Podobné typy pili IV jsou také přítomny u ostatních patogenních gramnegativních bakterií. [Hahn, 1997]



Obr.21. Model PAK pilusu. Uspořádání pilinových podjednotek do pětice. [Cachia a kol., 2003]

Oblast PA pilusu odpovědná za adhezní schopnost je lokalizována na špičce pilusu. Monoklonální protilátky vázající se specificky na tento konec pilusu inhibují jejich interakci s receptorovými buňkami, zatímco monoklonální protilátky proti jiné části pilusu neprokazují žádný inhibiční efekt. Pilinové geny z různých kmenů PA prokazují jistý polymorfismus v pilinové sekvenci. Jen asi 30 AK u N-konce proteinu je výrazně konzervo-

váno, jinak se často ve struktuře vyskytují hypervariabilní oblasti (viz Obr.22.). Tento konzervovaný úsek však není antigenně účinný. [Hahn, 1997]



Obr.22. Schéma srovnání aminokyselinové sekvence pilinu několika kmenů PA. Obdélníčky vyznačují antigenní determinanty. Očíslovaná místa ohraničená závorkou představují povrchové domény. [Hahn, 1997]

Charakteristickým strukturním elementem objevujícím se u všech druhů PA pilinů a také u dalších podobných bakterií je disulfidová smyčka uvnitř řetězce situovaná na C-konci proteinu. Tato disulfidová smyčka obsahuje 12 až 17 aminokyselin, dle druhu PA. Oblast DSL je vazebnou doménou pilinu.

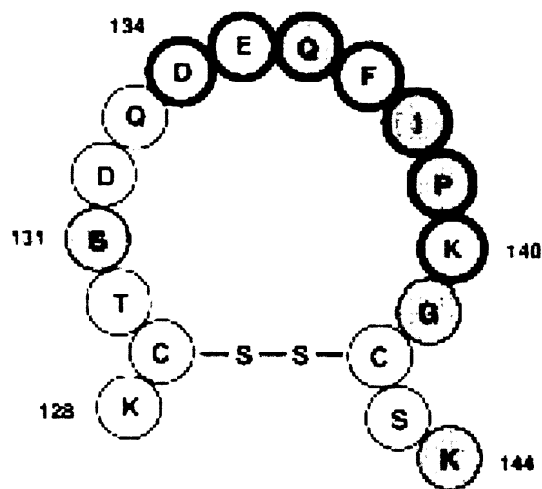
V testech in vitro například vazbu pili kompetitivně inhibuje syntetický peptid obsahující homologní DSL oblast. Mimo to i monoklonální protilátky proti této oblasti blokují adhezenci PA na epitelální buňky. Jestliže se pozmění aminokyselinová sekvence v oblasti této smyčky aby neobsahovala ani žádné cysteiny, tak adherence těchto pili je z 90 % redukována a je srovnatelná s kmeny PA bez pili. Snížení vazebné schopnosti jde ruku v ruce s virulencí, která je tímto zmenšena asi 40krát. [Hahn, 1997]

Ve srovnání pěti AK sekvencí z různých druhů PA, které jsou k vidění na obrázku 23 jsou konzervovány pouze cysteiny v polohách 129 a 142 – pro vytvoření nezbytného disulfidového můstku a prolin v pozici 139.

	129	131	β1					138	β2				144				
PAK	K	C	I	S	D	Q	D	L	Q	F	I	P	K	G	C	S	K
PAO	A	C	K	S	I	Q	D	P	M	F	I	P	K	G	C	D	N
KB7	S	C	A	T	T	V	D	A	K	F	R	P	N	G	C	T	D
CD4	T	C	T	S	T	Q	E	E	M	F	I	P	K	G	C	N	K
K122-4	A	C	T	S	N	A	D	N	K	Y	I	P	K	T	C	Q	I

Obr.23. Srovnání aminokyselinových sekvencí oblasti DSL pěti druhů PA [Hahn, 1997]

I přes zjevnou variabilitu v sekvencích spolu tyto pili různých kmenů PA soutěží o vazbu na stejné receptory epiteliálních buněk (glykosfingolipidy). Nezáleží zde totiž ani tolik na primární struktuře jako na sekundární a ta se zdá být velmi konzervovaná mezi všemi kmeny PA. Disulfidová smyčka znázorněná na obrázku 24 kromě disulfidického můstku obsahuje ještě 2 charakteristické β-otáčky, které formují strukturněji mnohem více konzervovanou oblast (viz Obr.25.). [Hahn, 1997]





Obr.25. Struktury pilinového peptidu. A a B představují struktury PAK a KB7 peptidů v energetickém minimu. Některé postranní řetězce důležité pro adhezi jsou zvýrazněny, jinak je znázorněna základní kostra peptidů. [Cachia a kol., 2003]

Stejný cíl pro vývoj své antiadhesivní vakcíny a také pro vývoj monoklonálních protilátek si vybrali Cachia a Hodges [Cachia a kol., 2003], ve své práci popisují identifikaci a izolaci těchto malých peptidů z různých kmenů PA.

Tato DSL vazebná doména fungující i jako epitop se i mně zdá být vhodným cílem pro účely pasivní imunizace. Zablokováním vazebného místa by se dalo zabránit i adhezi bakterie. Aminokyselinová sekvence vybraného epitopu je zvýrazněna v následující Sekvenci 4, sekvence některých dalších kmenů PA viz Obr.23.

**Sekvence 4: Aminokyselinová sekvence prekursoru typu IV pilinu PA4525 (PAO) s vyznačenou oblastí DSL, [www.pseudomonas.com]**

MKAQKGFTLIELMIVVAIIIGILAAIAIPQYQNYVARSEGASALATINPLK  
TTVEESLSRGIAGSKIKIGTTASTATETYVGVEPDANKLGVI AVAIEDS  
GAGDITFTFQTGTSSPKNATKVITLNRTADGVW



## 5. Pasivní imunizace

Většina předchozích zmiňovaných pokusů byla prováděna aktivní imunizací. Ovšem v případě bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a její infekce u pacientů CF či u pacientů jinak nemocných a imunitně oslabených je aktivní imunizace potenciálně nebezpečná, protože je značnou zátěží pro pacienta. U pacientů CF se navíc po aktivní imunizaci rozvíhá pro ně velmi nežádoucí zánětlivá odpověď. Z těchto důvodů by bylo vhodnější použít pasivní imunizaci. Na tento způsob imunizace se zatím stále ještě zaměřuje méně prací a proto by zde bylo možno najít skrytý potenciál pro vhodnou profylaxi proti PA infekcím.

Pokud je diskutována aktivní a pasivní imunizace, byly by vhodné popsat podrobněji strukturu protilátek a jejich základní funkci v imunitním procesu.

### 5.1. Hlavní funkce imunitního systému

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu. Tato funkce se projevuje takto:

- obranyschopnost – imunitní systém rozpozná vnější škodliviny a chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům
- autotolerance – imunitní systém rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje toleranci vůči nim
- imunitní dohled – imunitní systém rozpozná vnitřní škodliviny, tj. průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné (zmutované) buňky

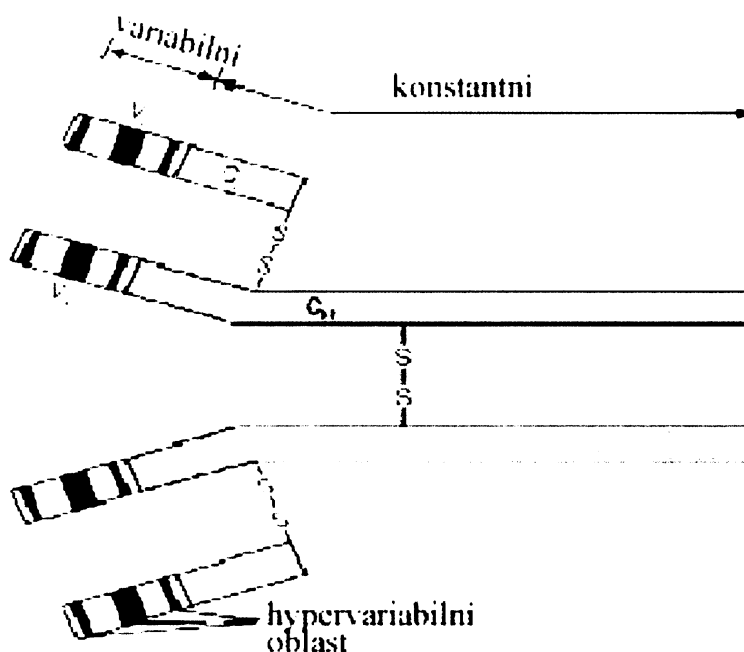
[Hořejší a kol., 2002]

## 5.2. Protilátky

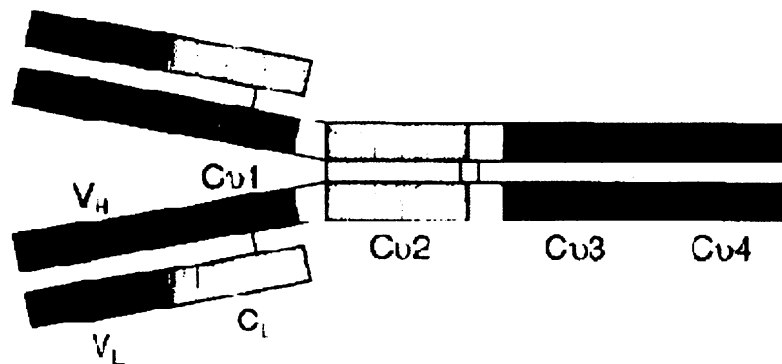
### 5.2.1. Protilátky (lidské, tedy savčí)

#### Struktura protilátek:

Protilátky jsou tvořeny dvěma těžkými (H) řetězci kovalentně spojenými disulfidickými můstky. Ke každému těžkému řetězci je disulfidickým můstkem připojen ještě jeden lehký (L) řetězec. Těžké se skládají ze čtyř a lehké řetězce ze dvou imunoglobulinových domén. Domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní a označují se  $V_H$  a  $V_L$ , ostatní domény jsou konstantní (viz Obr.26.). Variabilní domény H a L řetězců vytvářejí společně vazebné místo pro antigen. Těžké řetězce jsou v Fc části (opsonizující imunoglobuliny se touto oblastí váží na Fc-receptory fagocytů) glykosylovány. [Hořejší a kol., 2002]



Obr.26. Struktura savčí protilátky IgG



Obr.27. Struktura slepičí protilátky IgY [Warr a kol., 1995]

### Třídy imunoglobulinů:

- IgM – pentamer; prvním typem protilátek tvořící se po setkání s antigenem; neváže se na Fc-receptory fagocytů, účinně aktivuje komplement
- IgG (IgG1 – IgG4) – nejhojnějším imunoglobulinem, dobře se váže na Fc-receptory fagocytů; IgG1 a IgG3 aktivují dobře komplement
- IgA – slizniční a sérová forma; sekretovaný na povrch sliznic; neaktivuje komplement; funguje jako opsonin
- IgE – uplatňuje se v obranných reakcích proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích; alergické reakce
- IgD – na povrchu B buněk

[Hořejší a kol., 2002]

### Mechanismy působení protilátek:

- neutralizace – protilátky mohou blokovat (neutralizovat) aktivitu toxinů, virů a jiných mikroorganismů tím, že se váží na kritické epitopy mající toxickou nebo adhezenční funkci
- opsonizace – vazbou protilátky na mikroorganismy a antigenní částice se podstatně zlepšuje nebo vůbec umožňuje jejich pohlcení fagocyty a aktivují se destrukční mechanismy fagocytů

- aktivace komplementu – protilátky navázané na antigen mohou aktivovat komplement; to přispívá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů a rozvoji zánětlivé reakce [Hořejší a kol., 2002]

Pro naše účely by bylo nejvhodnější, aby protilátky, které budeme používat pro pasivní imunizaci nedávaly podnět k rozvoji zánětlivé reakce. Těmto podmínkám vyhovují ptačí imunoglobuliny izolované z vaječných žloutků a označované IgY, které se poslední době těší stále větší oblibě. Mají totiž oproti savčím protilátkám některé výhody.

### 5.2.2. Slepíčí protilátky:

Předtím, než slepice snese vejce, sekretuje do vaječného žloutku krevní imunoglobuliny typu IgG a imunoglobuliny IgA a IgM do bílku. Koncentrace protilátek ve žloutku je dokonce 1,3 – 1,9 krát vyšší než v krvi slepice. Po vylíhnutí kuřete přejdou IgG ze žloutku do jeho krve, zatímco IgA a IgM z bílku zajišťují pasivní imunizaci trávicího traktu. [Sunwoo a kol., 1996]

Na rozdíl od savců, ptáci mají pouze 3 třídy výše zmiňovaných Ig. Ale například struktura ptačího IgG je odlišná od savčího. Ptačí IgG obsahuje 4 konstantní domény, zatímco savčí IgG pouze 3. Proto byly ptačí IgG přejmenovány na IgY (egg yolk). Struktura IgY – viz Obr.27.

IgY na rozdíl od IgG nereagují se savčími Fc-receptory a neaktivují savčí komplement. Z důvodu snížené flexibility protilátek IgY komplexy antigen-IgY precipitují méně než imunokomplexy se savčími protilátkami. [Ntakarutimana a kol., 1992] Tyto všechny vlastnosti IgY jsou potencionálně výhodné pro pacienty CF, které právě nejvíce obtěžuje zánětlivá reakce a tvorba imunokomplexů zhoršující funkci plic.

Výhodou použití IgY rozhodně je i menší stres experimentálního zvířete. Slepici se totiž jen odebere snesené vajíčko, kdežto u savců se protilátky získávají odběry krve či dokonce srdeční punkcí vedoucí ke smrti zvířete.

Výtěžnost slepičích IgY oproti získávání protilátek z králičí krve je až 30 krát vyšší. Přestože je koncentrace IgY ve vaječném žloutku menší než v krvi savců, je slepice schopna vyprodukovat až 25 g protilátek za rok, neboť vejce obsahující 70-150 mg IgY jsou sle-

picí snášena téměř denně. Stejně množství protilátek bychom dostali za rok z krve 30 králíků. Specifické protilátky proti určitému antigenu použitému pro imunizaci představují 0,1 -10 % celkové produkce IgY (závisí na použitém antigenu). [Hatta a kol., 1993], [Hodek a kol., 2003]

V obecné rovině jsou vejce důležitým zdrojem živin, obsahují všechny proteiny, lipidy, vitaminy, minerály a růstové faktory potřebné pro rozvíjející se embryo. Ale vejce obsahují i komponenty, které mají další funkce kromě vyživovací. Zajímavé biologické aktivity s nimi asociované jsou: antimikrobiální aktivita, antiadhesivní vlastnosti, imuno-modulace, protirakovinová aktivita, aktivita snižující vysoký krevní tlak, antioxidační vlastnosti a inhibice proteas. [Kovacs-Nolana kol., 2005]

Antimikrobiální aktivita je spojována především s IgY a pak také s lysozymem. IgY protilátky byly již produkovány proti mnohým bakteriím a virům a prokázaly svou schopnost vázat se na jejich části a inhibovat infekci jimi způsobovanou a její symptomy. Působily například proti bakteriím *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans*. Potlačení infekce *H. pylori* u lidí bylo dosaženo podáváním jogurtu s IgY proti enzymu *H. pylori*. V další studii s lidmi orálně podávané IgY proti *Pseudomonas aeruginosa* zabraňovaly PA kolonizacím plic u CF pacientů. [Kovacs-Nolan a kol., 2005]

### **Účinnost pasivní imunizace podáváním IgY: [Kollberg a kol., 2003]**

Protože vejce jsou normální složkou lidské potravy, není zde prakticky žádné riziko nežádoucích vedlejších efektů při orálním podávání IgY. Lidé si nevytváří protilátky proti orálně podávaným slepičím IgY.

Podmínkou začlenění do studie byla jedna pozitivní kultura PA ze sputa a žádné známky chronické infekce PA. Této studii se zúčastnili vybraní pacienti CF. Kontrolní skupina byla vybrána retrospektivně.

Experiment začal intramuskulární imunizací slepic dvěma kmeny PA. Po iniciální imunizaci slepice obdržely ještě další 3 upomínací dávky v dvoutýdenních intervalech a pak každé 2-3 měsíce. Z nasbíraných vajec byly poté získávány specifické IgY.

Ve studiích in vitro prokázaly protilátky IgY proti PA redukci adheze PA na lidské epitelální buňky, ale neinhibovaly růst bakterií.

Pacientům byla předepsána denní dávka 50 mg IgY, což je asi množství obsažené v polovině jednoho vejce.

Efekty imunizace za celé časové období jsou shrnuty v následující tabulce 6:

Tabulka 6 Další pokračování studie [Kollberg a kol., 2003]

	<b>imunizovaná skupina</b>	<b>kontrolní skupina</b>
počet pacientů	10	21
průměrný věk	11,5	10,6
počet nasbíraných kultur	315	560
pozitivní PA kultury	14	105
procento pozitivních kultur	4,4%	18,7%
pacienti bez pozitivní kultury	4 (40%)	3 (14%)
chronicky kolonizovaní pacienti	0	5

Efekt pasivní imunizace orálním podáváním IgY – stručné shrnutí:

- prodloužení intervalu mezi první a následující infekcí PA
- odkládá počátek chronické infekce PA; u nikoho z imunizované skupiny se neroz-  
běhla chronická infekce PA
- redukuje stupeň kolonizace a tedy snižuje množství potřebných antibiotik

[Kollberg a kol., 2003]

Pro vyvození nějakých závažnějších závěrů z této studie by bylo potřeba více účastníků. Nicméně tento způsob imunizace má slibný potenciál, ale bylo by účinnější použít pro vytvoření specifických protilátek namísto celé bakterie pouze nějaký její antigen. Vytvořit tyto antigeny pro účely pasivní imunizace bylo cílem mé bakalářské práce.

5. **Závěr - vytypované antigeny**

Dle zjištěných informací a výsledků různých studií se nejvhodnějšími antigeny vybranými z virulenčních faktorů bakterie *Pseudomonas aeruginosa* pro účely pasivní imunizace rizikových skupin zdají být tyto vybrané peptidové sekvence shrnuté v následující tabulce 7. (Podrobnější informace o jednotlivých antigenech a důvod jejich výběru viz předchozí text.)

Tabulka 7 Vytypované peptidové antigeny virulenčních faktorů *Pseudomonas aeruginosa* pro účely pasivní imunizace

<b>původ antigenu – virulenční faktor</b>	<b>oblast v AK sekvenci antigenu</b>	<b>AK sekvence vybraného epitopu</b>
vnější membránový protein F (Epi8)	329-342	NATAEGRAINRRVE
vnější membránový protein F (Epi1)	160-173	QYGLEKRDNGHQGE
vnější membránový protein F (Epi6)	285-298	TDAYNQKLSERRAN
bičík, protein z jeho špičky fliD (typ B)	195-210	DDGSGGNTSLSQLAFD
bičík, protein z jeho špičky fliD (typ A)	195-210	VQGSSGLENFNIGSVG
pili, C-konec pilinového proteinu (PAO kmen)	128-144	ACKSTQDPMFTPKGCDN
pili, C-konec pilinového proteinu (PAK kmen PA)	128-144	KCTSDQDEQFIPKGCSK
pili, C-konec pilinového proteinu (KB7 kmen PA)	128-144	SCATTVDAKFRPNGCTD
pili, C-konec pilinového proteinu (CD4 kmen PA)	128-144	TCTSTQEEMFIPKGCNK
pili, C-konec pilinového proteinu (K122-4 kmen PA)	128-144	ACTSNADNKYLPKTCQT

Dále vše může probíhat ve stručnosti následovně: Z antigenu se připraví účinný imunogen a jím se slepice imunizuje.

Protože peptid sám o sobě má příliš malou molekulovou hmotnost aby vyvolal produkci protilátek, je třeba z něho připravit imunogen - tedy zvýšit molekulovou hmotnost navázáním peptidu na nějakou jinou molekulu (nosič), aby vzniklý konjugát již mohl být použit k imunizaci a navodil patřičnou imunitní odpověď v produkčním organismu.

Imunogen můžeme připravit několika způsoby:

- Peptid lze propojit pomocí bifunkčního činidla přes SH skupinu cysteinu na nosičový protein – např. šnečí protein KLH či hovězí sérový albumin (BSA).
- Další možností je přímá syntéza několika peptidů na hydrofilním polymeru (TENTA gel).
- Nebo se vytvoří „lysinový strom“ - kdy se na obě aminoskupiny lysinu naváže karboxylovou skupinou další lysin, až takto vznikne postupným větvením 8 ramen, na nichž je peptid v 8 kopiích syntetizován

[Hodek, osobní sdělení]

Výhodou těchto imunogenů je lepší exprese peptidových antigenů, která amplifikuje signál pro tvorbu protilátek.

Jakmile slepice začne projevovat dostatečnou imunitní odpověď na imunizaci, jsou od ní pravidelně sbírána vejce. Z těch se izolují specifické protilátky IgY, které se použijí na přípravu vakcíny – dle způsobu podávání protilátek. Následně může být realizována pasivní imunizace a jednotlivé fáze klinických studií na potvrzení bezpečnosti a účinnosti vakcíny.



## 7. Shrnutí

Současná léčba PA infekcí (či spíše snaha o zmírnění a udržení nekolonizovaného stavu pacienta) podáváním velkých dávek antibiotik (a jejich vzájemnou kombinací) není příliš účinná a je značnou zátěží pro organismus pacienta. Proto se v poslední době hledají jiné způsoby, zaměřené více na prevenci těchto infekcí. Zvířatům jsou podávány oslabené PA a ty potom produkují proti nim polyklonální protilátky. Cílenější metoda spočívá v nalezení vhodných antigenů PA, kterými jsou buď aktivně imunizováni pacienti CF nebo se jimi imunizují zvířata, která potom vyrábí požadovanou protilátku. Tato protilátka (poly- nebo monoklonální) může být pak následně použita pro pasivní imunizaci pacientů CF či imunosupresivních pacientů, kterým akutně hrozí infekce PA a pro které by byla aktivní imunizace nebezpečná. Pacienti, kteří jsou infikováni PA totiž prokazují znatelně vyšší koncentraci protilátek proti PA až když se infekce dostane do chronického stavu. Jestliže je pacient už kolonizován PA, znamená to většinou, že PA vytvořila mukoidní formu a má kolem sebe anaerobní obal, přes který se samozřejmě nemohou dostat ani antibiotika, ani protilátky. Proto je nejúčinnější co nejrychlejší léčba anebo - v případě imunizace včasná a dostatečně účinná imunitní odpověď prostřednictvím vlastních protilátek proti PA (či protilátek již v krvi přítomných). Tato včasná imunitní odpověď je schopná zabránit dalšímu rozšíření infekce.

Bakterie má více druhů antigenů, většinou spojených přímo s nějakým virulenčním faktorem bakterie - příkladem tohoto typu antigenu může být třeba lipopolysacharid (LPS) nebo toxin A. Další antigeny jsou asociovány s adhesní schopností bakterie - za to jsou odpovědné povrchové struktury, především OprF, flagella a pili.

Schopnost bakterie dobře se adherovat na epitelální buňky tkáně je první a zásadní předpoklad k rozvoji bakteriální infekce následované kolonizací s výslednými patologickými změnami hostitelské tkáně. Na základě těchto znalostí lze PA infekcím předejít tím, že zabráníme jejich adhesi - blokováním důležitých adhezenčních faktorů. Tedy v ideálním případě použitím protilátek vytvořených na správný antigen odpovědný za vazebnou schopnost PA můžeme znemožnit adhesi bakterie na epitelální buňky hostitelské tkáně.

Nejdůležitějším krokem je vybrat vhodný antigen a připravit z něj dostatečně účinný imunogen. Vytypovat vhodné antigeny bylo účelem této práce a peptidové sekvence vytypovaných peptidových antigenů jsou společně shrnuty v tabulce 7.

Připravený imunogen by dále mohl být použit k aktivní imunizaci. Jenže v souboru potenciálních hostitelů PA se většinou nevyskytují příliš zdraví jedinci schopni dobré imunitní odpovědi. Jednu skupinu tvoří imunosupresivní pacienti trpící nějakým defektem imunity nebo beroucí léky na potlačení imunity (například po transplantacích) anebo jinak oslabené jedince (HIV pozitivní, nemocné rakovinou, leukémií, s těžkými popáleninami) - u kterých je vzhledem k jejich špatné funkci imunity či aktuálnímu zdravotnímu stavu jasné, že pro ně bude vhodnější pasivní imunizace. Druhou skupinou jsou pacienti CF, které by sice bylo možno v některých případech podrobit aktivní imunizaci (především v mladším věku a ty jedince, kteří se ještě nesetkali s PA), ale vzhledem k jejich celkovému zdravotnímu oslabení by toto očkování mohlo zhoršit jejich aktuální stav a je tedy i zde na místě využít spíše pasivní imunizaci. Pasivní imunizace je také používána k přímé léčbě a v tomto případě PA je to jistě vhodná alternativa k podávání antibiotik, jejichž účinnost je často omezená.

Proti použití aktivní imunizace hovoří i ten fakt, že vlastní protilátky po vazbě na antigen aktivují komplement a tím zapříčiňují tvorbu imunokomplexů, které jsou důvodem vzniku zánětlivé reakce. Navíc mohou ještě více zahušťovat hlen u CF pacientů. Stejný problém nastává i s pasivní imunizací, protože aplikované protilátky savčího původu mají velmi podobnou strukturu a tudíž po interakci s antigenem navodí zánětlivou reakci. Východisko z této situace spočívá v aplikaci slepičích protilátek.

Slepičí protilátky získané z vajec jsou srovnatelné a v některých ohledech i lepší než savčí. Slepice má podobný imunoglobulin lidskému IgG označovaný IgY, který neaktivuje komplement jako lidské IgG a tak nevzniká ani zánětlivá reakce. Slepičí protilátky jsou tedy ideálním nástrojem pro pasivní imunizaci. I přesto, že jejich izolace z vaječných žloutků je náročnější, z celkového pohledu je jejich příprava ekonomická a způsob získávání je neinvazivní a nemusí se proto zvažovat etické hledisko využívání zvířat.

Předpokládáme, že by izolované protilátky byly přidávány do inhalací či se užívaly perorálně. Sloužily by pak buď jako pasivní imunizace proti infekci PA jako prevence podávaná všem rizikovým skupinám ohroženým touto bakterií - tedy jako prevence nebo zároveň i jako podpůrný léčebný prostředek u již infikovaných pacientů.

## 8. Seznam použité literatury

- 1) Ansorg R. A., Knoche M. E., Spies A. F., Kraus C. J.: Journal of Clinical Mikrobiology 20, 84-88, (1984)
- 2) Arnold H., Bumann D., Felies M., Gewecke B., Sorensen M., Gessner J. E., Freihorst J., von Specht B. U., Baumann U.: Infection and immunity 72, 6546-6553, (2004)
- 3) Arora S. K., Ritchings B. W., Almira E. C., Lory S., Ramphal R.: Infection and Immunity 66, 100-1007, (1998)
- 4) Arora S. K., Dasgupta N., Lory S., Ramphal R.: Infection and Immunity 68, 1474-1479, (2000)
- 5) Arora S. K., Neely A. N., Blair B., Lory S., Ramphal R.: Infection and Immunity 73, 4395-4398, (2005)
- 6) Azghani A. O., Idell S., Bains M., Hancock R. W. E.: Microbial Pathogenesis 33, 109-114, (2002)
- 7) Baumann U., Mansouri E., von Specht B.-U.: Vaccine 22, 840-847, (2004)
- 8) Brimer C. D., Montie T. C.: Journal of Bakteriology 180, 3209-3217, (1998)
- 9) Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. a kol.: Lékařská mikrobiologie (bakteriologie, virologie, parazitologie), Marvil, Praha 2 (1996)
- 10) Cachia P. J., Hodges R. S.: Biopolymers 71, 141-168, (2003)
- 11) Campbell A. P., Spyropoulos L., Wong W. Y., Irvin R. T., Sykes B. D.: Biochemistry 42, 11334-11346, (2003)
- 12) Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H., Prince A.: Infection and immunity 66, 43-51, (1998)
- 13) Hahn H. P.: Gene 192, 99-108, (1997)
- 14) Hatta H., Kim M., Yamamoto T.: Agric. Biol. Chem. 54, 2531, (1990)
- 15) Hodek P., Koblas T., Rýdlová H., Kubíčková B., Šulc M., Hudeček J., Stiborová M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 659-673, (2003)
- 16) Hodek P.: osobní sdělení
- 17) Holder I. A.: Vaccine 22, 831-839, (2004)
- 18) Hořejší V., Bartůňková J. a kol.: Základy imunologie, Triton, Praha (1998)
- 19) Johansen H. K., Norregaard L., Gotzsche P., Pressler T., Koch C., Hoiby N.: Pediatric Pulmonology 37, 427-432, (2004)

- 20) Keene W. a kol.: JAMA 291, 981-985, (2004)
- 21) Kollberg H., Carlander D., Olesen H., Wejaker P., Johannesson M., Larsson A.: Pediatric Pulmonology 35, 433-440, (2003)
- 22) Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y.: Journal of Agricultural and Food chemistry 53, 8421-8431, (2005)
- 23) Lai Z., Kimmel R., Petersen S., Thomas S., Pier G., Bezabeh B., Luo R., Schreiber J. R.: Vaccine 23, 3264-3271, (2005)
- 24) Lang A. B., Schaad U. B., Rudeberg A., Wedgwood J., Que J. U., Furer E., Cryz S. J.: The Journal of Pediatrics 127, 711-777, (1995)
- 25) Lang A. B., Horn M. P., Imboden M. A., Zuercher A. W.: Vaccine 22S, S44-S48, (2004 A)
- 26) Lang A. B., Rudeberg A., Schoni M. H., Que J. U., Furer E., Schaad U. B.: The Pediatric Infectious Disease Journal 23, 504-510, (2004 B)
- 27) Loris E., Tielker D., Jaeger K., Wyns L.: J. Mol. Biol. 331, 861-870 (2003)
- 28) Mareš J., Kočárek E. a Sedláček Z.: Praktikum z molekulární genetiky, 2. LF UK, Praha (2001)
- 29) Ntakarutimana V., Demedts P., van Sande P. Scharpé S.: J. Immunol. Methods 153, 133, (1992)
- 30) Parke, J. L.: The Plant Health Instructor, 245-231, (2000)
- 31) Price B. M., Galloway D. R., Baker N. R., Gilleland L. B., Staczek J., Gilleland H. E. jr.: Infection and immunity 69, 3510-3515, (2001)
- 32) Rosok M. J., Stebbins M. R., Connelly K., Lostrom M. E., Siadak A. W.: Infection and Immunity 58, 3819-3828, (1990)
- 33) Sunwoo H. H., Nakano T., Dixon W. T., Sim J. S.: Poultry Sci. 75, 342, (1996)
- 34) Schaad UrsB., Lang A. B., Wedgwood J., Ruedeberg A., Q., John U., Furer E., Cryz S. J. Jr: Lancet 338, 1236-37 (1991)
- 35) Taccetti G., Campana S., Marianelli L.: The Journal of Pediatrics 129, 619, (1996)
- 36) Vávrová V. a kol.: Cystická fibróza v praxi, Kreace s. r. o., Praha 5 (1999)
- 37) Vávrová V. a kol. Centra CF Motol: Cystická fibróza (příručka pro nemocné, jejich rodiče a přátele), Professional Publishing, Praha (2000 A)
- 38) Vávrová V., Zemková D., Macek M. jr., Pohunek P.: Forum Medicinae 3, 49 - 55, (2000 B)

- 39) Walker R. I., Blanchard T., Braun J. M., Cebra J. J., Cross A. S., Fattom A., Gian-  
nasca P. J., Holder I. A.: Vaccine 22, 801-804, (2004)
- 40) Warr M., Magor S., Higgins A.: Immunology Today 16, 392-398, (1995)
- 41) Worgall S., Krause A., Rivara M., Hee K.-K., Vintayen E. V., Hackett N. R., Roel-  
vink P. W., Bruder J. T., Wickham T. J., Kovesdi I., Crystal R. D.: The Journal of  
clinical Investigation 115, 1281-1289, (2005)
- 42) Yoon S. S., Hennigan R. F., Hilliard G. M., Ochsner Urs A., Parvatiyar K., Kamani  
M. C., Allen H. L., DeKievit T. R., Gardner P. R., Schwab U., Rowe J. J., Iglewski  
B. H., McDermott T. R., Mason R. P., Wozniak D. J., Hancock R. E. W., Parsek M.  
R., Noah T. L., Boucher R. C., Hassett D. J.: Developmental Cell 3, 593-603,  
(2002)
- 43) (<http://textbookofbacteriology.net>) , 2004, Kenneth Todar University of Wiscon-  
sin-Madison Department of Bacteriology
- 44) [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]