

Syntetyczne oligodeoksynukleotydy klasy C z niemetylowanymi sekwencjami CpG jako składnik zwiększający immunogenność komercyjnej szczepionki dla cieląt zawierającej antygen IROMP *Mannheimia haemolytica*

Rozprawy Naukowe UP w Lublinie 396, Lublin 2019, ss. 96

Syndrom oddechowy bydła (BRDC – bovine respiratory disease complex) stanowi jeden z bardziej istotnych problemów zdrowotnych w odchowcie cieląt. Trudności we wdrażaniu skutecznej immunoprofilaktyki tego schorzenia wynikają głównie z niskiej skuteczności dostępnych na rynku preparatów szczepionkowych. Zwiększenie skuteczności działania dostępnych szczepionek można osiągnąć, stosując precyzyjnie wyselekcjonowane adiuwanty. Jako potencjalne adiuwanty, wzmacniające przede wszystkim komórkową gałąź odpowiedzi immunologicznej w stosunku do antygenów szczepionkowych, mogłyby zostać wykorzystane syntetyczne oligodeoksynukleotydy, które zawierają niemetylowane sekwencje CpG naśladujące w działaniu bakteryjne DNA. W dostępnym piśmiennictwie nie ma zbyt wiele doniesień poświęconych możliwości wykorzystania CpG ODN jako adiuwanta szczepionkowego w preparatach przeznaczonych dla bydła. Nieliczne publikacje dotyczą głównie szczepionek z antygenami doświadczalnymi lub antygenami patogenów wewnątrzkomórkowych, w których CpG ODN klasy B łączone było zazwyczaj z innymi adiuwantami.

W prezentowanych badaniach własnych zastosowano CpG ODN klasy C jako składnik adiuwanta w szczepionce przeznaczonej dla bydła, co stanowi nowatorski element podejmowanych działań. Celem pracy było (1) określenie immunostymulacyjnych efektów CpG ODN klasy C w stosunku do bydlęcy PBMC w badaniach *in vitro* i porównanie ich do rezultatów uzyskanych przez inne klasy syntetycznych oligodeoksynukleotydów, dla których aktywność taka została już potwierdzona, (2) prześledzenie dynamiki kształtowania się odporności humoralnej i komórkowej po podaniu cielętom opracowanego biopreparatu celem jego porównania ze szczepionką komercyjną, (3) ocena stopnia bezpieczeństwa stosowania CpG ODN klasy C jako dodatku do szczepionek dla cieląt.

W badaniach *in vitro* na bydlęcych PBMC oceniono zdolności do indukowania przez CpG ODN proliferacji tych komórek oraz sekrecji przez nie IFN- γ . W badaniu cytometrycznym określono typy komórek, które w największym stopniu ulegały immunostymulującym właściwościom CpG ODN. W reakcjach Real-Time PCR oceniono ekspresję genów dla cytokin charakterystycznych w odpowiedzi Th1-zależnej i Th2-zależnej oraz genów dla IP-10 i TLR9. Po potwierdzeniu właściwości immunostymulujących CpG ODN klasy C w stosunku do bydlęcych PBMC przystąpiono do zasadniczego etapu badań, który polegał na podawaniu cielętom 0,5 mg CpG ODN wspólnie z komercyjną szczepionką zawierającą jako antygen IROMP *M. haemolytica*. W badaniach *in vivo* oceniono surowicze poziomy swoistych w stosunku do IROMP przeciwciał IgG, IgG1, IgG2 i IgM w okresie do 70. dnia po pierwszym szczepieniu. Oznaczono również poziomy IP-10 w surowicach szczepionych cieląt. W trakcie doświadczenia, poprzez codzienny pomiar wewnętrznej ciepłoty ciała oraz oznaczenie surowiczego poziomu haptoglobiny, oceniono u szczepionych cieląt reakcję ostrej fazy.

CpG ODN klasy C okazał się najbardziej efektywny w stymulacji *in vitro* proliferacji bydlęcych PBMC, a głównym typem komórek proliferujących w odpowiedzi na ten ODN były limfocyty B. CpG ODN klasy C najefektywniej indukował wytwarzanie IFN- γ w hodowlach bydlęcych PBMC w dawce 8 μ g/ml. Uzyskane średnie wartości stężenia IFN- γ w supernatantach hodowli były jednak statystycznie istotnie niższe ($p < 0,05$) niż uzyskane w przypadku CpG ODN klasy A. W reakcjach Real-Time PCR wszystkie badane geny w bydlęcych PBMC uległy amplifikacji pod wpływem ich stypulacji przez wykorzystane w badaniu CpG ODN klasy C w dawce 8 μ g/ml.

Dodanie CpG ODN klasy C do komercyjnego preparatu szczepionkowego pozytywnie wpłynęło na wzrost jego immunogenności, o czym świadczą wysokie poziomy surowiczych przeciwciał IgG, IgG1, IgG2 i IgM swoistych dla IROMP. Zdecydowanej poprawie uległa zarówno swoista odpowiedź typu humoralnego (zwiększenie poziomu przeciwciał IgG1 i IgM), jak i mediowana przez limfocyty Th1 odpowiedź typu komórkowego, o czym świadczyły wysokie poziomy przeciwciał IgG2 oraz indukcja wytwarzania IFN- γ . Wykazano po raz pierwszy, że IP-10 może być u bydła wiarygodnym biomarkerem zwiększonego wytwarzania IFN- γ w odpowiedzi na CpG ODN. Badania kliniczne dowiodły, że CpG ODN klasy C są względnie bezpieczne dla cieląt.

Na podstawie wyników prezentowanych badań można stwierdzić, że inicjowane przez CpG ODN klasy C różnorodne efekty immunologiczne potwierdzają ich zdolność do działania jako adiuwanty szczepionkowe, indukujące szybsze, silniejsze i dłużej trwające mechanizmy swoistej odpowiedzi immunologicznej na IROMP *M. haemolytica*. Uzyskane wyniki badań mogą przyczynić się do opracowania formuły szczepionki pozwalającej indukować zarówno humoralną, jak i komórkową odpowiedź immunologiczną w stosunku do antygeny szczepionkowego. W praktyce powinno to ograniczyć zachorowania cieląt na choroby układu oddechowego.