

# Πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη της λοίμωξης από Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού

Ανδρέας Μεντής

Από το 1983 που απομονώθηκε για πρώτη φορά το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) έχει γίνει σημαντική πρόοδος στη μικροβιολογία, επιδημιολογία, διαγνωστική και θεραπευτική της λοίμωξης που προκαλείται στο γαστρικό βλεννογόνο του ανθρώπου από το μικρόβιο αυτό. Σημαντικά ερωτηματικά όμως εξακολουθούν να υπάρχουν. Για παράδειγμα, αγνοούμε τους ακριβείς παράγοντες είτε του μικροβίου είτε του ξενιστή, που συμβάλουν στον αποικισμό του βλεννογόνου, προκαλούν το σχηματισμό ελκών ή την ανάπτυξη νεοπλασιών και ευθύνονται για τη διαφορά στα συμπτώματα μεταξύ των διαφόρων μολυσμένων ατόμων. Η ανεπαρκής γνώση μας φαίνεται ότι οφείλεται μεταξύ άλλων και στην έλλειψη μοντέλου πειραματοζώου που να μιμείται πλήρως την ανθρώπινη νόσηση από *H. pylori* όσον αφορά την ανάπτυξη ελκών και αδενοκαρκινώματος. Στα περισσότερα πειραματοζώα, μετά από ενδογαστρική χορήγηση του βακτηρίου επάγεται γαστρίτιδα, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις μοιάζει με τη λεμφοκυτταρική γαστρίτιδα που παρατηρείται στα παιδιά και λιγότερο με την οξεία/χρόνια γαστρίτιδα των ενηλίκων. Παρά τους διάφορους περιορισμούς όμως, η μελέτη με τη χρήση πειραματοζώων έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να παρέχει πληροφορίες για τους

παράγοντες παθογένειας του *Helicobacter*, την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και το σχηματισμό νεοπλασιών. Ιδιαίτερη είναι η συμβολή των μοντέλων στη δοκιμή νέων μορίων για την ανάπτυξη εμβολίων και νέων θεραπευτικών σχημάτων.

Στην παρουσίαση αυτή θα αναφερθούν με συντομία τα πειραματικά μοντέλα που βασίζονται στη χρήση του *H. pylori* ως βακτηρίου για την πρόκληση λοίμωξης, και θα δοθεί έμφαση στα ευρύτερα διαδομένα και νεότερα μοντέλα.

### **Πρωτεύοντα θηλαστικά**

Η λοίμωξη που προκαλείται πειραματικά σε πρωτεύοντα θηλαστικά, εκτός του ανθρώπου, φαίνεται ότι προσεγγίζει περισσότερο από κάθε άλλο πειραματικό μοντέλο τη λοίμωξη που παρατηρείται στον άνθρωπο. Το υψηλό κόστος όμως καθώς και ηθικά προβλήματα περιορίζουν σημαντικά τη χρησιμότητα των μοντέλων αυτών.

### **Χοίρος**

Το πρώτο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο γνοτοβιοτικός χοίρος, δηλαδή χοίρος που από τη γέννησή του έχει εκτεθεί σε συγκεκριμένα και γνωστά είδη μικροβίων. Με το μοντέλο αυτό για πρώτη φορά διαπιστώθηκε ότι η ουρεάση του μικροβίου και η κινητικότητα του είναι απαραίτητες προϋποθέσεις παθογένειας. Η διαφορά της λοίμωξης που προκαλείται σε σχέση με τους ανθρώπους είναι ότι στους χοίρους η διήθηση του γαστρικού βλεννογόνου από πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα είναι μικρή. Στα μειονεκτήματα του μοντέλου είναι ότι τα πειραματόζωα μεγαλώνουν γρήγορα και δεν είναι δυνατόν να παραμείνουν σε κλουδιά δύο μήνες μετά τη γέννησή τους.

### **Σκύλοι, γάτες**

Νεογέννητοι σκύλοι και γάτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της λοίμωξης από *H. pylori*. Στους σκύλους η ιστολογική εικόνα της λοίμωξης μοιάζει με την αντίστοιχη του ανθρώπου, αλλά το μικροβιακό φορτίο είναι μικρό και δεν εμφανίζεται έκδηλη νόσηση ή συμπτώματα. Μειονεκτήματα του μοντέλου στις γάτες είναι η συχνή παρουσία στις κατοικίδιες γάτες σπειροειδών βακτηρίων που μοιάζουν με το *H. pylori*, όπως το *H. felis*.

## Mongolian gebrils (γεβρίλοι) και Guinea pigs (ινδικά χοιρίδια)

Σε πρόσφατες μελέτες αναφέρεται ότι τα Mongolian gebrils μετά πειραματική μόλυνση από *H. pylori* αναπτύσσουν σημαντικό βαθμού γαστρίτιδα και γαστρικά έλκη. Επίσης, η χημική καρκινογένεση στο μοντέλο αυτό, ενισχύεται από ενδογαστρική χορήγηση *H. pylori*. Η ομοιότητα της λοίμωξης με του ανθρώπου κάνει το μοντέλο ελκυστικό, αν και η σχετική έλλειψη εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων για τη μελέτη διαφόρων ανοσολογικών παραμέτρων μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξή του.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η χρησιμοποίηση ινδικών χοιριδίων, τα οποία φαίνεται ότι αναπτύσσουν μετρίου βαθμού πολυεστιακή γαστρίτιδα του άντρου μετά από πειραματική μόλυνση με το στέλεχος Sydney του *H. pylori* (βλ. κατωτέρω) που έχει προσαρμοσθεί στα ποντίκια.

## Ποντίκια

Αποτελούν ένα πολύ καλό πειραματόζωο. Είναι σχετικά φθηνά, πολλαπλασιάζονται εύκολα και σε αντίθεση με τα άλλα πειραματόζωα υπάρχει διαθέσιμος μεγάλος αριθμός αντιδραστηρίων για τη μελέτη ανοσολογικών παραμέτρων. Τα ζώα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ήδη από το τέλος της δεκαετίας του 1980 για πειραματικές μολύνσεις με *Helicobacter*. Το πρώτο επιτυχημένο μοντέλο ήταν με τη χρησιμοποίηση του *H. felis* σε ποντίκια C57BL/6. Τα ποντίκια αυτά ανέπτυσαν αρχικά έντονη γαστρίτιδα και κατόπιν ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου μετά μόλυνση από το *H. felis*. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε στα πρώτα πειράματα για ανάπτυξη εμβολίων και συνεχίζει να χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Στα μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται η έλλειψη γονιδίου *cagA* στο *H. felis* και η μη προσκόλληση του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, που θεωρούνται σημαντικές προϋποθέσεις για την παθογένεια του *H. pylori*.

Το 1995 στη Lausanne, η Ευρωπαϊκή Ομάδα Μελέτης του *Helicobacter Pylori* έβαλε για πρώτη φορά κριτήρια για την προτυποποίηση των πειραματικών μοντέλων με ποντίκια που χρησιμοποιούνται κυρίως για ανάπτυξη εμβολίων. Τα κριτήρια αυτά είναι χρήσιμα για τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων διαφόρων ερευνητικών ομάδων. Έτσι, τα στοιχεία που πρέπει να αναφέρονται για κάθε πειραματικό μοντέλο είναι: 1) Ο βαθμός αποικισμού του πειραματοζώου και της συνοδού γαστρίτιδας, 2) Ο αριθμός των κυττάρων *H. pylori* ανά γραμμάριο γαστρικού ιστού, 3) Η παρουσία ή απουσία προσκολλήσεως, 4) Η μεγαλύτερη χρονική περίοδος που έχει παρατηρηθεί αποικισμός και 5) Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών *in vitro* μετά τις οποίες το στέλεχος διατηρεί τη λοιμογόνο δραστηριότητά του.

Το 1997 ανακοινώνεται από τους Lee και συν μοντέλο με χρήση στέλεχους *H. pylori* ανθρώπινης προελεύσεως προσαρμοσμένου στο ποντίκι σύμφωνα με τα κριτήρια της Lausanne. Το στέλεχος αυτό ονομάστηκε Sydney Strain SS1 το οποίο οι ερευνητές διαθέτουν σε οποιοδήποτε εργαστήριο ενδιαφέρεται. Το SS1 είναι *cagA* και *vacA* θετικό στέλεχος που απομονώθηκε από μία Ελληνικής καταγωγής ασθενή της Αυστραλίας που έπασχε από δωδεκαδακτυλικό έλκος και είχε οικογενειακό ιστορικό σοβαρών γαστρικών νόσων. Ο αποικισμός των πειραματοζώων είναι σταθερός αν και σε διαφορετικό βαθμό και εξαρτάται από τη φυλή του πειραματοζώου. Στα BALB/c ποντίκια η λοίμωξη είναι μετρίου βαθμού αλλά στα C57BL/6 επίπεδα μέχρι  $10^{6-7}$  CFU/mL μπορεί να υπάρχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το βακτήριο αποικίζει κυρίως το άντρο προσκολλώμενο στο γαστρικό βλεννογόνο. Το μοντέλο αυτό έχει αναπτυχθεί πρόσφατα στο Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε όλα σχεδόν τα πειραματικά μοντέλα η ιστολογική εικόνα που ακολουθεί τη μόλυνση από το SS1 δεν μιμείται ακριβώς την αντίστοιχη στον άνθρωπο. Σε μερικές φυλές ποντικών παρατηρείται ατροφική γαστρίτιδα, αλλά χωρίς προηγούμενο στάδιο ενεργού/χρόνιας γαστρίτιδας. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει κάποιος αδιευκρίνιστος μέχρι σήμερα παράγοντας στον άνθρωπο σχετικά με την ανάπτυξη γαστρίτιδας, που λείπει από τα πειραματικά μοντέλα. Παρά τα μειονεκτήματα αυτά πάντως, τα ποντίκια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για τη μελέτη ουσιών που είναι υποψήφιος για χρησιμοποίηση σε εμβόλια, όπου το ζητούμενο είναι η παρουσία ή απουσία φλεγμονής και η ύπαρξη ή όχι νόσου.

### Εξελίξεις στα πειραματικά μοντέλα

Αν και στα περισσότερα μοντέλα δεν υπάρχει ακριβής αντιστοίχιση με τη νόσηση στον άνθρωπο, η συνεχής δημιουργία φυλών ποντικών με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ανοίγει νέους δρόμους στην έρευνα. Παράδειγμα αποτελούν τα διαγονιδικά ποντίκια και τα ποντίκια γονιδιακής στόχευσης (gene knockout).

Η τεχνολογία των **διαγονιδιακών ποντικών**, στηρίζεται στο ότι εάν ξένο DNA ενεθεί σε έμβρυα σε αρχικό στάδιο διαίρεσης, μπορεί να ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα των εμβρυϊκών κυττάρων και να διααιρεθεί μέσα σε αυτά κατά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους στους ιστούς του ενήλικου οργανισμού.

Η τεχνική περιλαμβάνει τη μικροένεση ξένου DNA αποτελούμενου από έναν υποκινητή συνδεδεμένο με την κωδικοποιούσα περιοχή ενός γονιδίου σε έναν από τους δύο προπυρήνες σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού στο στάδιο του ενός κυττάρου κάτω από ειδικό μικροσκόπιο. Το ξένο γονίδιο

ενσωματώνεται τυχαία στο χρωμόσωμα του εμβρύου-δέκτη σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα. Τα έμβρυα μεταφέρονται με χειρουργική επέμβαση στον ωαγωγό ψευδέγκυων θηλυκών ποντικών και αναπτύσσονται φυσιολογικά. Από τα ωάρια που επιβιώνουν 5-50% φέρουν το ενσωματωμένο γονίδιο και χαρακτηρίζονται ως διαγονιδιακά. Το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα, την παρουσία εσώνιων και ρυθμιστικών αλληλουχιών. Με κατάλληλη επιλογή ιστοειδικού υποκινητή υπάρχει η δυνατότητα έκφρασης του διαγονιδίου στα κύτταρα ενός μόνο ιστού.

Στα ποντίκια με τεχνολογία **διαγονιδιακής στόχευσης (gene knockout)** ο έλεγχος της θέσης ενσωμάτωσης του ξένου DNA στο γονιδίωμα του ποντικού και κατ' επέκταση της στόχευσης ενός ενδογενούς γονιδίου του ποντικού επιτυγχάνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό της γονιδιακής κατασκευής στόχευσης και του ενδογενούς γονιδίου, με αποτέλεσμα την αντικατάστασή του. Ο ομόλογος αυτός ανασυνδυασμός γίνεται στα εμβρυϊκά πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα της βλαστοκύστης που συμμετέχουν στο σχηματισμό όλων των ιστών συμπεριλαμβανομένης της γαμετικής σειράς. Ο ανασυνδυασμός αυτός επιτρέπει τη διακοπή της έκφρασης γονιδίων και την εισαγωγή με μεγάλη ακρίβεια ειδικών μεταλλάξεων μέσα σε γονίδια. Τα κύτταρα αυτά εισάγονται σε βλαστοκύστες και μεταφέρονται σε ψευδέγκυα θηλυκά ποντίκια. Με διασταυρώσεις των απογόνων παράγονται τελικά ζώα ομόζυγα για τη διακοπή του γονιδίου (knock out), τα οποία δεν παράγουν πλέον το προϊόν του αρχικού γονιδίου.

Τα διαγονιδικά ποντίκια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται με επιτυχία για τη μελέτη υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, για την προσκόλληση του *H. pylori*, την επίδραση των γονιδίων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) του ποντικού στη λοίμωξη και του ρόλου των ιντερλευκινών, ή των επιφανειακών IgA στην προστασία από πειραματική μόλυνση.

## Συμπέρασμα

Τα πειραματικά μοντέλα αναμένεται να δώσουν νέες, σημαντικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή. Αυτό θα γίνει: 1. Με τη χρήση ισογενών μεταλλαγμένων βακτηριακών στελεχών *H. pylori* που αποικίζουν πειραματόζωα. Στην περίπτωση αυτή θα βοηθήσει σημαντικά η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος του μικροβίου που έχει ήδη ολοκληρωθεί και 2. Η χρησιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων ποντικών για τη μελέτη διαφόρων παραγόντων και συνεπειών της λοίμωξης από *H. pylori*, όπως είναι η ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου και η κυτταρική ή χυμική

ανοσολογική απόκριση. Η δημιουργία τέλος ποντικών με τροποποιημένη την παραγωγή κυτταροκινών μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία μοντέλου που να προσομοιάζει περισσότερο στη λοίμωξη του ανθρώπου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lee A. Animal models for host-pathogen interaction studies. *Br Med Bull* 1998;54:163-73.
2. Sutton P, Wilson J, Lee A. Further development of the *Helicobacter pylori* mouse vaccination model. *Vaccine* 2000;18:2677-85.
3. Nedrud J. Animal models for gastric *helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;24:243-50.
4. Pasparakis M, Kollias G. Production of cytokine transgenic and knockout mice. In *Cytokines: A practical approach*, Balkwill F, ed, IRL Press, Oxford (2<sup>nd</sup> edition) 1995;297.
5. Lee A, O'Rourke J, Corazon De Ungria M, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon M. A standardized model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386-97.
6. Chen W, Shu D, Chadwick V. *Helicobacter pylori* infection in interleukin-4-deficient and transgenic mice. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:987-92.
7. Jenks P, Labigne A, Ferrero R. Exposure to metronidazole in vivo readily induces resistance in *Helicobacter pylori* and reduces the efficacy of eradication therapy in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:777-81.
8. Michetti P, Wadstrom T, Kraehenbuhl J, Lee A, Kreiss C, Blum A. Frontiers in *Helicobacter pylori* research - pathogenesis, host response, vaccine development and new therapeutic approaches. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:717-22.
9. Σγούρας Δ, Καραφώτη Φ, Πετράκη Λ, Μεντής Α. Ελικοβακτήριο του πυλωρού. Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός πειραματικού μοντέλου επιμόλυνσης σε ποντίκια. Ανακοίνωση στο Συνέδριο "Μοριακή Βιολογία και κυτταρογενετική στην υγεία". Πανελλήνια Ένωση Βιολόγων, Αθήνα, 8-1- Δεκεμβρίου 2000.