

Received: 2012.07.30
Accepted: 2014.03.05
Published: 2014.05.15

Modele zwierzęce w badaniach nad przebiegiem zakażeń *Helicobacter pylori**

Animal models for the study of *Helicobacter pylori* infection

Eliza Miszczyk, Maria Walencka, Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Gram-ujemna pałeczka *Helicobacter pylori* jest powszechnie uznawana za główny czynnik etiologiczny przewlekłego aktywnego zapalenia błony śluzowej żołądka, wrzodów trawiennych, raka żołądka oraz chłoniaka związanego z tkanką limfatyczną błon śluzowych (mucosa-associated lymphoma tissue, MALT). Nadal niewiele wiadomo o naturalnej historii tego zakażenia, ponieważ dolegliwości z nim związane pojawiają się w różnym czasie lub zakażenie przebiega bezobjawowo. W związku z rosnącą opornością pałeczek *H. pylori* na powszechnie stosowane antybiotyki trwają poszukiwania innowacyjnych schematów eradykacji tego patogenu. Liczba gatunków w obrębie rodzaju *Helicobacter* spp. szybko wzrasta, a zastosowanie nowoczesnych technik molekularnych stale wzbogaca wiedzę na ich temat. Ze względu na ograniczenia związane z wykonywaniem badań *in vivo* na ludziach w badaniach nad przebiegiem zakażenia *H. pylori* szeroko są wykorzystywane modele zwierzęce. Celem pracy jest przedstawienie stosowanych modeli badawczych, wskazujących związek między kolonizacją błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* a schorzeniami wywołanymi przez ten drobnoustrój. Poszczególne modele zwierzęce pozwalają na prześledzenie naturalnej historii zarówno ostrego, jak i przewlekłego zakażenia *H. pylori* w powiązaniu ze zmianami patologicznymi i przebiegiem procesów odpornościowych oraz odniesienie uzyskanej wiedzy do etiopatogenezy zakażeń występujących u ludzi. Badania przedkliniczne na zwierzętach podatnych na zakażenie *H. pylori* są nieodzownym elementem zdobycia niezbędnej wiedzy na temat rozwoju chorób, będących konsekwencją takich zakażeń oraz strategii ich leczenia i profilaktyki.

Słowa kluczowe:

modele zwierzęce • *Helicobacter pylori* • gatunki *Helicobacter* • zapalenie żołądka • rak żołądka • szczepionki

Summary

The Gram-negative bacillus *Helicobacter pylori* is widely recognized as a major etiologic agent responsible for chronic active gastritis, peptic ulcers, the development of gastric cancer and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). Still, little is known about the natural history of *H. pylori* infection, since patients usually after many years of not suffering from symptoms of the infection are simply asymptomatic. Since the research investigators carried out on human models has many limitations, there is an urgent need for the development of an animal model optimal and suitable for the monitoring of *H. pylori* infections. This review summarizes the recent findings on the suitability of animal models used in *H. pylori* research. Several animal models are useful for the assessment of pathological, microbiological and immunological consequences of infection, which makes it possible to monitor the natural

* Praca finansowana ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na realizację projektu badawczego „Wyznaczniki reakcji zapalnej i odpornościowej w modelowym zakażeniu *Helicobacter pylori* u świnek morskich” (UMO-2013/09/N/NZ6/00805) oraz ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na realizację grantu o numerze N N303 451738.

Keywords:	history of <i>H. pylori</i> infection. Preclinical investigations on animal models are an essential stage of research which enrich the knowledge on treatment and prevention strategies. animal models • <i>Helicobacter pylori</i> • <i>Helicobacter</i> species • gastritis • gastric cancer • vaccine
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1102583
Word count:	5710
Tables:	2
Figures:	–
References:	44

Adres autorki: mgr Eliza Miszczyk, Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail: eliza-miszczkyk@wp.pl

Wykaz skrótów: **CagA** – cytotoxyna związana z wyspą patogenności (cytotoxin-associated gene A antigen); **CFU** – jednostka tworząca kolonię (colony forming unit); **CT** – toksyna cholery (cholera toxin); **CTB** – podjednostka B toksyny cholery; **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid); **EHS** – wątrobowo-jelitowe gatunki *Helicobacter* (enterohepatic *Helicobacter* species); **HSP60** – białka szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 60 kDa (heat shock proteins 60 kDa); **IARC** – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer); **Le** – antygeny Lewis (Lewis antigens); **LT** – termolabilna enterotoksyna; **MALT** – chłoniak związany z tkanką limfatyczną błon śluzowych (mucosa-associated lymphoma tissue); **NAP** – białko aktywujące neutrofile (neutrophil-activating protein); **NHL** – chłoniak nieziarniczy (non-Hodgkin lymphoma); **OMV** – zewnętrzne pęcherzyki błonowe (outer membrane vesicles); **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction); rRNA – rybosomowy RNA (ribosomal RNA); **rUre** – rekombinowana ureaza (recombinant urease); **SPF** – wolne od patogenów (specific pathogen free); **WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization); **VacA** – toksyna wakuolizująca (vacuolating cytotoxin gene A).

WPROWADZENIE

Gram-ujemna, mikroaerofilna pałeczka *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) została po raz pierwszy wyizolowana przez dwóch australijskich badaczy – B. Marshalla i R. Warrena w 1983 r. ze śluzu żołądkowego ludzi z chronicznym stanem zapalnym [23]. W 2005 r. obaj uczeni zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za wykazanie związku między obecnością spiralnych bakterii w żołądku a zwiększeniem ryzyka rozwoju choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy [31]. Od prawie 60 tysięcy lat *H. pylori* kolonizuje błonę śluzową żołądka ludzi, i niemal u wszystkich osób zakażonych tym mikroorganizmem rozwija się zapalenie błony śluzowej żołądka, które może trwać przez dziesięciolecia. Dzięki koewolucji z ludźmi, bakterie te mogą przekazywać i odbierać sygnały z nabłonka żołądka, doprowadzając do stanu dynamicznej równowagi, w której biorą udział zarówno czynniki bakterii, jak i gospodarza. Jednak, długotrwałe interakcje wywołują zmiany błony śluzowej żołądka o charakterze patologicznym [30]. Obecnie pałeczki *H. pylori* są uznawane za główny czynnik etiologiczny wielu chorób przewodu pokarmowego, takich jak: ostre zapalenie błony śluzowej

żołądka, przewlekłe zanikowe zapalenie żołądka, metaplasja jelitowa, wrzody trawienne i inne. Badania epidemiologiczne wskazują, że zakażenie *H. pylori* ma ścisły związek z rozwojem raka żołądka. W związku z tym, w 1994 r. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer, IARC) w porozumieniu ze Światową Organizacją Zdrowia (World Health Organization, WHO), sklasyfikowała *H. pylori* jako czynnik rakotwórczy I klasy [17]. Ponadto, badania doświadczalne z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych wykazały, że utrzymujące się zakażenie *H. pylori* znacznie zwiększa ryzyko choroby wrzodowej żołądka, gruczolakoraka żołądka i chłoniaka nieziarniczego (non-Hodgkin lymphoma, NHL). Eradykacja *H. pylori* istotnie zmniejsza ryzyko rozwoju wrzodów trawiennych lub gruczolakoraka żołądka u zakażonych osób bez zmian o charakterze złośliwym, co dostarcza dowodów, że ten drobnoustrój wpływa na wczesne etapy kancerogenezy żołądka [30]. Mimo wysokiego odsetka zakażonych *H. pylori* osób (ponad 50% populacji ludzkiej), u niewielkiej części są stwierdzone objawy kliniczne. Do rozwoju chorób nowotworowych dochodzi zaledwie u około 1% chorych. Jednak należy podkreślić, że *H. pylori* jest czynnikiem etiologicznym

Tabela 1. Gatunki *Helicobacter* i ich prawdopodobny udział w chorobach ludzi i zwierząt

Gatunki <i>Helicobacter</i>	Nosiciele	Możliwe stany chorobowe	Źródło
Żołądkowe			
<i>H. pylori</i>	człowiek, kot, makak	zapalenie żołądka i/lub dwunastnicy, wrzody trawienne	[2] [43]
<i>H. heilmanni</i>	człowiek, pies, kot, małpa, świnia	zapalenie żołądka, wrzody trawienne	[2] [43]
<i>H. bizzozeronii</i>	pies, kot, człowiek	zapalenie żołądka	[2,43]
<i>H. felis</i>	pies, kot, mysz	zapalenie żołądka	[19,43]
<i>H. salomonis</i>	pies, kot	nie opisano	[19,43]
<i>H. suis</i>	świnia	nie opisano	[19,43]
<i>H. mustelae</i>	fretka, norki	zapalenie żołądka, wrzody	[19,43]
<i>H. nemestrinae</i>	lapunder	nie opisano	[43]
<i>H. acinonyx</i>	gepard	zapalenie żołądka	[43]
<i>H. rappini</i>	owca, pies	poronienie	[43]
<i>H. aurati</i>	chomik	nie opisano	[43]
<i>H. muridarum</i>	mysz, szczur	nie opisano	[43]
<i>H. cetorum</i>	wieloryb, delfin	wrzody żołądka i przełyku	[14]
<i>H. cynogastricus</i>	pies	nie opisano	[11]
Wątrobowo-jelitowe (EHS)			
<i>H. cinaedi</i>	człowiek, małpa, chomik	zapalenie jelit, sepsa, zapalenie odbytnicy, zapalenie wątroby	[2,19,43]
<i>H. fennelliae</i>	człowiek	zapalenie jelit, sepsa, zapalenie odbytnicy	[2,43]
<i>H. westmaedii</i>	człowiek	zapalenie jelit, sepsa	[2]
<i>H. rappini</i>	człowiek, mysz	martwica wątroby	[2,19,43]
<i>H. canis</i>	pies, człowiek	zapalenie żołądka i jelit, zapalenie wątroby	[43]
<i>H. hepaticus</i>	mysz, człowiek	zapalenie wątroby, rak wątroby	[2,19,43]
<i>H. bilis</i>	mysz, szczur, pies, kot	zapalenie pęcherzyka żółciowego? zapalenie wątroby	[2,19,43]
<i>H. rodentum</i>	mysz	nie opisano	[43]
<i>H. trogontum</i>	szczur	nie opisano	[43]
<i>H. pullorum</i>	człowiek, kurczak	zapalenie jelita grubego, zapalenie wątroby	[2,19,43]
<i>H. pametensis</i>	ptak, świnia	nie opisano	[43]
<i>H. cholecystus</i>	chomik	włóknienie trzustki	[43]
<i>H. mesocricetorum</i>	chomik	nie opisano	[43]
<i>H. canadensis</i>	człowiek?	zapalenie jelit	[2]
<i>H. ganmani</i>	mysz, szczur	nie opisano	[4]

65% wszystkich nowotworów żołądka [31]. Główną przyczyną patogenności tej bakterii jest zdolność do wywołania przewlekłego, wieloletniego stanu zapalnego, który jest wynikiem nadmiernego pobudzenia odpowiedzi immunologicznej gospodarza z udziałem wszystkich typów komórek odpornościowych i różnego rodzaju cytokin. Takie nieustanne stymulowanie układu odpornościowego, które zwykle pozwala na samoistne wyeliminowanie drobnoustrojów z organizmu, nieoczekiwanie prowadzi do rozwoju zmian patologicznych

w błonie śluzowej żołądka [6]. Należy także podkreślić, że wyniki wielu badań laboratoryjnych wskazują na zdolności pałeczek *H. pylori* do hamowania aktywności komórek odpornościowych, a co za tym idzie ograniczonej ich skuteczności w walce z takimi zakażeniami [5,12,29,35]. A zatem rozwój choroby jest zależny nie tylko od bakteryjnych czynników wirulencji, ale również od indywidualnych predyspozycji gospodarza oraz czynników środowiskowych (np. warunków sanitarno-higienicznych, diety ubogiej w witaminy) [36].

GATUNKI *HELICOBACTER*

W latach dziewięćdziesiątych XX w. nastąpił gwałtowny rozwój badań nad pałeczkami z rodzaju *Helicobacter*. Ich rezultatem jest m.in. ciągły wzrost liczby nowo odkrywanych gatunków zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, dokładne poznawanie i wyjaśnianie mechanizmów patogenego działania *H. pylori* na organizm ludzki, opracowywanie testów wykrywających to zakażenie oraz metod diagnostycznych (inwazyjnych i nieinwazyjnych), a także wdrażanie badań z wykorzystaniem zwierząt. Obecnie rodzaj *Helicobacter* obejmuje około 38 gatunków, z których 29 jest oficjalnie zarejestrowanych. Są one wykrywane niemal w każdym badanym zwierzęciu – od kurcząt po wieloryby (z możliwym wykluczeniem kozy) [14,19]. Wiedza na temat tych spiralnych bakterii jest stale wzbogacana przez zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych oraz technik diagnostycznych [3].

Ze względu na cechy morfologiczne, właściwości biochemiczne oraz miejsce bytowania, pałeczki *Helicobacter* spp. podzielono na dwie grupy: drobnoustroje żołądkowe (zasiedlające początkowy, górny odcinek przewodu pokarmowego) oraz drobnoustroje wątrobowo-jelitowe (Enterohepatic *Helicobacter* Species, EHS) (tab. 1). Przeżycie pałeczek *Helicobacter* należących do pierwszej grupy jest możliwe dzięki wytwarzanej przez nie ureazie, która neutralizuje kwaśne środowisko żołądka (proces hydrolizy mocznika do dwutlenku węgla i amoniaku). Żołądek ludzi jest najczęściej kolonizowany przez *H. pylori*, ale także przez *H. heilmanni*, *H. felis* i *H. mustellae*. Bakterie wątrobowo-jelitowe należące do drugiej grupy zostały wykryte po raz pierwszy u laboratoryjnych gryzoni. Wykazano, iż mogą one kolonizować dolny odcinek przewodu pokarmowego, czyli jelito biodrowe, okrężnicę i prośnicę oraz wątrobę (drogi żółciowe) wielu gatunków zwierząt, a w sprzyjających warunkach mogą doprowadzić do stanu zapalnego tych narządów i wywołać zmiany chorobowe. Nie kolonizują śluzówki żołądka, mimo, że mają wiele wspólnych cech morfologicznych i fizjologicznych z gatunkami żołądkowymi [2,3].

Drobnoustroje należące do rodzaju *Helicobacter* mają duże wymagania odżywcze. Do wzrostu potrzebują podłoż wzbogaconych krwią lub surowicą, warunków mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), temperatury w zakresie 36-42°C oraz 3-14-dniowej inkubacji. Hodowla większości gatunków jest bardzo trudna, a w niektórych przypadkach wręcz niemożliwa. Ponadto ich zdolność do wzrostu jest zależna od wymagań gatunkowych, co oznacza, że na ich wzrost może wpływać np. obecność antybiotyków (cefsulodyny, kwasu nalidyksynowego, trimetoprimu, wankomycyny) lub innych czynników gatunkowo-swoistych [10]. Gatunki *Helicobacter* różnią się między sobą m.in. zdolnością wytwarzania ureazy. Bakterie, takie jak np. *H. pylori*, *H. heilmanni*, *H. felis* są ureazo-dodatnie, natomiast inne, np. *H. canis*, *H. pullorum*, *H. fennelliae* nie wytwarzają tego enzymu. Wyizolowany z próbek kału psów *H. canis* nie wytwarza również katalazy [19]. Obecnie na szybką identyfikację gatun-

ków *Helicobacter*, bez konieczności prowadzenia czasochłonnej i wymagającej hodowli, pozwalają nowoczesne metody biologii molekularnej z zastosowaniem sekwencjonowania podjednostki 16S rRNA i reakcji łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) [3]. Zwiększająca się liczba izolowanych gatunków *Helicobacter* wymaga dalszych badań, pozwalających ocenić ich rolę w patogenezie chorób u ludzi i zwierząt [10].

MODELE ZWIERZĘCE

Choroba wrzodowa wywołwana przez *H. pylori* jest poważnym schorzeniem, które w ciągu ostatnich dziesięcioleci stało się przedmiotem badań naukowców z całego świata. Najczęściej do zakażenia dochodzi we wczesnym dzieciństwie drogą ustno-ustną, kałowo-pokarmową bądź ustno-żołądkową, a głównie z powodu braku odpowiedniej higieny (zwłaszcza mycia rąk) [36]. Istotnym problemem jest ponadto wzrastający stopień oporności *H. pylori* na antybiotyki, wchodzące w skład schematu eradykcyjnego. Wykazano, iż schematy leczenia tzw. drugiego i trzeciego rzutu są nieskuteczne prawie u 20% przypadków. Te obserwacje motywują do podejmowania licznych badań mających na celu poznanie niejasnej etiologii tej choroby i wielu jej powikłań, a także badań oceniających możliwość zastosowania innowacyjnych schematów eradykacji z użyciem alternatywnych chemioterapeutyków czy antybiotyków hamujących rozwój zakażenia *H. pylori* [18].

W związku z ograniczoną możliwością wykonywania badań *in vivo* wśród pacjentów, są w tym celu wykorzystywane zwierzęta laboratoryjne. Wybór odpowiedniego modelu zwierzęcego jest podyktowany założeniami hipotezy badawczej, wyposażeniem potrzebnym do przeprowadzenia doświadczeń, a także żywotnością zwierząt i materiałem pozyskiwanym do badań. Przydatność laboratoryjnego modelu zwierzęcego powinna być oceniana w taki sposób, aby jak najlepiej scharakteryzować poszczególne etapy zakażenia. Zastosowanie potencjalnego modelu zwierzęcego powinno być ocenione z jednej strony na podstawie jego podatności na zakażenie i możliwości wywołania objawów chorobowych, a z drugiej podobieństwa przebiegu i konsekwencji zakażenia do obserwowanych u ludzi [32]. Olbrzymią zaletą prowadzenia doświadczeń na zwierzętach jest dostępność badanych osobników, a także możliwość przeprowadzenia inwazyjnych testów czy pobierania rozległego materiału tkanekowego. Dokonując wyboru najbardziej odpowiedniego modelu i gatunku zwierząt doświadczalnych, powinny być brane pod uwagę: znaczne różnice międzygatunkowe oraz inne czynniki, takie jak: wiek, płeć, dieta, hodowla, stan hormonalny i odpornościowy. Ponadto należy pamiętać, że wyniki uzyskane w doświadczeniach na zwierzętach mogą się różnić od wyników u ludzi, dlatego wyciągnięte wnioski należy ostrożnie przenosić z badań przedklinicznych na badania kliniczne [24].

Opracowanie modeli zwierzęcych jest ważnym aspektem badania naturalnej historii patogenezy *Helicobacter*

pylori. Zmiany wywołane przez *H. pylori* u wybranego zwierzęcia powinny być zawsze dokładnie zbadane. Ich podobieństwo do zmian obserwowanych u ludzi może wskazać czy użycie tego modelu przyczyni się do zrozumienia różnych mechanizmów chorobotwórczych zaangażowanych w rozwój ludzkiej choroby wywołanej przez *H. pylori*. Istnieje więc potrzeba opracowania kilku modeli zwierzęcych, aby potwierdzić tezę o roli pałeczek z rodzaju *Helicobacter* w różnych aspektach tego zakażenia u człowieka [28].

Idealny model zwierzęcy odzwierciedlający zakażenie *H. pylori* powinien: imitować charakterystyczne objawy ludzkiej choroby, być powszechnie dostępny dla badaczy, łatwy i tani w przeprowadzeniu badań (np. endoskopii, terapii) oraz nie opierać się na wykorzystaniu gatunków zagrożonych. Ponadto zwierzę powinno mieć nawyki żywieniowe oraz cechy fizjologiczne przewodu pokarmowego podobne do ludzkich. Do tego typu badań zaleca się wykorzystywanie zwierząt konwencjonalnych utrzymywanych w warunkach częściowej izolacji (semi barrier condition), wolnych od zoonoz, niepoddanych mutacji, podatnych na kolonizację przez ludzkie izolaty, a nie tylko przez szczepy pochodzenia zwierzęcego. Niemniej jednak najważniejszym wyzwaniem dla idealnego modelu zwierzęcego do badań przebiegu zakażeń *H. pylori* jest uzyskanie wysokiego stopnia kolonizacji tymi bakteriami oraz udokumentowanie istniejącego zakażenia za pomocą różnorodnych technik [28].

Niektórzy autorzy wskazują na zasadnicze różnice między przewlekłym (ustabilizowanym) zakażeniem a wczesną (ostrą) fazą, która rozwija się u osób zaraz po procesie kolonizacji błony śluzowej żołądka przez pałeczki *H. pylori*. Przebieg ostrego zakażenia u ludzi jest szczególnie trudny do przeanalizowania, ponieważ eksperymentalne zakażenie ludzi jest nieetyczne oraz wczesne stadium zakażenia jest trudne do rozpoznania ze względu na brak swoistych badań diagnostycznych. Podkreśla to szczególną potrzebę opracowania zwierzęcych modeli do prześledzenia zakażenia *H. pylori* [7].

Nie istnieje idealny model zwierzęcy, który wiernie imitowałby rozwój choroby u człowieka. Obecnie stosowane modele pozwalają na ocenę konkretnego stadium zakażenia. Aby wiarygodnie i sprawnie ocenić efekty nowo wprowadzanych terapii, opracowano wiele modeli zwierzęcych imitujących procesy patologiczne u człowieka. Do tych celów zastosowano następujące zwierzęta laboratoryjne: świnie gnotobiotyczne (zakażone tylko znanymi, określonymi drobnoustrojami), ssaki z rodzaju naczelnych, koty, psy oraz różne gatunki gryzoni (szczury, myszy, myszokoczek mongolskie i świnki morskie). Od niedawna do prześledzenia zakażenia *Helicobacter* są wykorzystywane również transgeniczne myszy i myszy knock-out. Każdy z powyższych modeli ma swoje wady i zalety, jednak wybór któregośkolwiek z nich jest podyktowany tym, w jakim stopniu dany model pozwala na realizację zamierzonych celów doświadczalnych [26].

ŚWINIE GNTOBIOTYCZNE

Modelem zwierzęcym zastosowanym po raz pierwszy w badaniach nad zakażeniem *H. pylori* były prosięta gnotobiotyczne, dzięki którym wykazano, iż cytotoksyna, powiązana z wyspą patogenności (CagA), ureaza oraz rzęski są niezbędnymi czynnikami wirulencji pierwszej fazy ostrego zakażenia [43]. Udowodniono, że żołądek świń jest zasiedlany przez kilka gatunków *Helicobacter* (zakażenie mieszane), jednak budowa ich błony śluzowej żołądka różni się znacząco od ludzkiej. Mimo barier ochronnych dróg rodnych, urodzone prosięta mogą być zakażone przez *H. pylori*. Zwierzęta całkowicie wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów (germ-free) można uzyskać w wyniku cesarskiego cięcia, a następnie przez prowadzenie hodowli w specjalnych izolatorach. Stan zapalny wywołany u prosiąt „germ-free” różni się od zapalenia żołądka u dorosłych ludzi, przybierającego charakter przewlekłego aktywnego zapalenia, charakteryzującego się obecnością nacieku komórkowego, w którego skład wchodzi nie tylko komórki jednojądrzaste, ale także neutrofile. Komórki te są odpowiedzialne w dużej mierze za uszkodzenie błony śluzowej i występowanie objawów klinicznych zapalenia żołądka. Natomiast u zakażonych prosiąt występuje zazwyczaj niewielka liczba granulocytów obojętnochłonnych (mimo, że limfocyty czy komórki plazmatyczne są obecne w osoczu – podobnie jak u ludzi). W tym kontekście, prosięta zakażone *H. pylori* mogą być dobrym odniesieniem do zakażenia występującego u dzieci, u których również obserwuje się niewiele neutrofilów. Pomimo braku lub niewielkiej liczby granulocytów obojętnochłonnych u zakażonych prosiąt odnotowano zarówno rozległe, jak i drobne wrzody trawienne, co zwiększa wiarygodność zastosowania tego modelu. W jednej z prac wykazano, że zastosowanie doustnej szczepionki przeciwko *H. pylori* (bez dodatku adiuwantu) lub immunizacji pozajelitowej u prosiąt zakażonych *H. pylori* doprowadziło do nieznacznej redukcji miana bakteryjnego przy jednoczesnym wzroście nacieku zapalnego, w tym neutrofilów. Pomimo, że prosięta zakażone *H. pylori* stanowią dość dobry model odwzorowujący zakażenie u ludzi, to jednak nie są powszechnie stosowane w badaniach laboratoryjnych nad skutecznością szczepionek. Wynika to prawdopodobnie ze względu na koszty i konieczność stosowania specjalnego wyposażenia [26,37].

Psy

Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka u psów występuje dosyć często. Do tej pory w żołądku tych zwierząt zidentyfikowano następujące gatunki *Helicobacter*: *H. canis*, *H. cynogastricus*, *H. felis*, *H. heilmanni*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. rappini*, *H. bilis* [11,27]. Stosunkowo niewiele badań na temat zakażenia *H. pylori* zostało przeprowadzonych u psów. Wykazano, że u gnotobiotycznych psów, cztery tygodnie po zakażeniu *H. pylori*, dochodziło do rozwoju przewlekłego zapalenia żołądka i wzrostu pH soku żołądkowego [27]. U szczeniąt rasy Beagle, zakażonych doustnie szczepem *H. pylori* pochodzenia

mysiego i monitorowanych przez 24 tygodnie, w ostrej fazie zakażenia występowały wymioty i biegunka, które ustępowały samoistnie. Dochodziło również do wzmożonej ekspresji IL-8 w komórkach nabłonkowych żołądka. Faza przewlekła charakteryzowała się zmianami w błonie śluzowej żołądka, powierzchniowymi nadżerkami, a w blaszce właściwej były widoczne nacieki leukocytów wielojądrzastych, które w ciągu kilku następnych tygodni tworzyły małe agregaty oraz grudki chłonne, otoczone granulocytami obojętnochłonnymi. Uważa się, że makroskopowe grudki, powstałe głównie w części antrum żołądka, są prekursorami chłoniaka typu MALT. Model ten dokładnie odzwierciedla zakażenie występujące u ludzi [33]. Jego wadą jest obecność gatunków *Helicobacter*, należących do naturalnej mikroflory [43].

Wykorzystując psy rasy Beagle, również sprawdzano skuteczność i bezpieczeństwo szczepionki złożonej z trzech rekombinowanych antygenów *H. pylori* (CagA, VacA i NAP) połączonych z Al(OH)₃, podawanej domięśniowo. Nie zaobserwowano żadnych działań niepożądanych oraz wykazano powstawanie przeciwciał klasy IgG dla każdego z trzech antygenów. Skuteczność miesięcznego programu szczepień okazała się lepsza niż tygodniowa, zarówno do eradykacji pałeczek *H. pylori*, jak i redukcji zapalenia błony śluzowej żołądka. Wyniki tych badań wskazują nie tylko na możliwość stosowania pozajelitowych szczepień przeciwko *H. pylori*, ale również na prowadzenie dalszych badań w kierunku optymalizacji programu szczepień, co mogłoby poprawić skuteczność i immunogenność szczepionki [34]. Gościniak i wsp., opierając się na wynikach badań, dotyczących występowania przeciwciał anty-*H. pylori* w surowicach osób zakażonych tymi bakteriami, wykazali częstsze występowanie swoistych przeciwciał klasy IgG w grupie psów z objawami dyspeptycznymi i zmianami w obrębie błony śluzowej żołądka niż w grupie kontrolnej. Bliższe poznanie związku pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a zapaleniem żołądka u psów jest trudne ze względu na konieczność zastosowania metod inwazyjnych (gastroskopii) [11].

KOTY

W żołądkach kotów zidentyfikowano obecność *H. felis*, *H. pametensis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeronii*. Ponadto udokumentowano, że koty mogą być naturalnie zakażone przez *H. pylori*, co prowadzi do zapalenia błony śluzowej żołądka. Pałeczki *H. pylori*, wyizolowane z badanych kotów, są znacznie mniejsze (0,5 x 1,5-3 μm) niż pozostałych gatunków, zakrzywione lub w kształcie litery S, przez co są łatwe do rozpoznania w preparatach mikroskopowych [27]. U zakażonych kotów rozwinęło się pęcherzykowe zapalenie śluzówki żołądka z małą do średniej liczby eozynofiliów i umiarkowaną infiltracją neutrofilów. Istnieją przypuszczenia, że domowe koty mogą być rezerwuarem pałeczek *H. pylori*. Najprawdopodobniej drogą zakażenia jest transmisja z człowieka na te zwierzęta, a nie odwrotnie. W badaniach nad szczepionką przeciwko *H. pylori* wykazano 20-krotne zmniejszenie gęstości tych bakterii u zwierząt otrzymujących

preparat szczepionkowy. Wymagane są dalsze badania, aby ocenić odpowiedź immunologiczną na zakażenie *H. pylori* u kotów [26]. Długoterminowe naturalne zakażenie *H. pylori* u kotów stanowi odpowiedni model badania patogenezy takich zakażeń ze względu na znaczną reaktywność komórek odpornościowych i zmiany błony śluzowej w odpowiedzi na uszkodzenia nabłonka wskutek przewlekłego zakażenia [43]. Podobnie jak u psów, powszechne występowanie spiralnych bakterii w przewodzie pokarmowym kotów ogranicza użyteczność tego modelu i wymaga dodatkowych kosztów obejmujących m.in. hodowlę kotów wolnych od patogenów (specific pathogen free, SPF) [26].

MYSZY

Najczęściej używanym modelem zwierzęcym do badań przedklinicznych jest mysz ze względu na dużą dostępność swoistych odczynników. Model ten ma wiele zalet, m.in.: nieskomplikowana i tania hodowla, duża liczba młodych w miocie, dostępność zwierząt, a przede wszystkim wysoki procent podobieństwa mysiego genomu z ludzkim [1]. Ponadto, wykorzystanie określonych szczepów myszy poddanych modyfikacjom genetycznym (myszy transgeniczne, myszy knock-out) pozwala na zbadanie roli poszczególnych genów gospodarza w interakcjach z *H. pylori*. Jednak największą wadą tego modelu jest niski stopień zapalenia błony śluzowej żołądka, a jak wiadomo nasilenie reakcji zapalnej odgrywa główną rolę w rozwoju raka żołądka. Wobec tego, następstwo zakażenia *H. pylori* w postaci nowotworu żołądka jest trudne do oceny w modelu mysim, co wpływa na jego niekorzyść [39].

Pod koniec lat 80. XX w. wiele ośrodków badawczych próbowało opracować myszy model zakażenia *H. pylori*. W 1991 r. Karita i wsp. wykorzystali do badań nagie myszy (nude mouse), uzyskane w wyniku mutacji genetycznej prowadzącej do uszkodzenia lub braku grasicy, czego efektem jest utrata odporności, ze względu na brak lub znaczne zmniejszenie liczby limfocytów T. Najbardziej widocznym skutkiem tej mutacji jest także brak owłosienia – cecha bardzo cenna w badaniach nad procesami nowotworzenia. U tych zwierząt wizualna ocena obecności zmian rakowych jest znacznie łatwiejsza. Karita i wsp., wykorzystując powyższy model, wykazali, że myszy mogą być efektywnie zakażone przez *H. pylori*, natomiast w przypadku myszy immunokompetentnych, przy zastosowaniu identycznych warunków, pojawia się jedynie przejściowe zakażenie. Pomimo, że nagie myszy nie nadają się do badania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, wynik ten uutorował drogę dla innych badaczy, którzy coraz częściej donoszą o możliwości zakażenia *H. pylori* immunokompetentnych gryzoni [26].

Uzyskanie modeli zwierzęcych imitujących choroby człowieka opiera się na dwóch technikach: transgenizie i „nokaucie” genowym. Pierwsza metoda polega na wprowadzeniu wielu kopii genu (zazwyczaj obcego gatunku) do komórek gospodarza, z zastosowaniem

mikroiniekcji lub odpowiednich wektorów. W ten sposób powstają organizmy, które mają trwale wbudowany gen (geny) i wytwarzają obcogatunkowe białka. Natomiast metoda „nokautu” polega na usunięciu określonej sekwencji genu, co jest równoznaczne z brakiem syntezy białka kodowanego przez wycięty gen [1]. Wykorzystując genetycznie modyfikowane myszy, można zbadać wpływ braku danego białka na nasilenie adhezji pałeczek *H. pylori* do komórek nabłonkowych myszy. Jednym z receptorów dla adhezyn *H. pylori* są reszty fukozy obecne w powierzchniowych polisacharydach ludzkich komórek nabłonkowych żołądka. Za pomocą opracowanego modelu myszy transgeniczných, charakteryzujących się występowaniem reszt fukozy uwidocznił rozwój procesów patologicznych podczas zakażenia *H. pylori* w porównaniu do zwierząt kontrolnych [26]. Z wykorzystaniem myszy transgeniczných przeprowadzono również badania dotyczące roli białka CagA *H. pylori*. Skomplikowane przemiany szlaków metabolicznych indukowane przez to białko, dostarczane przez IV system sekrecji do komórek gospodarza, mogą odgrywać ważną rolę w procesie nowotworzenia. Doświadczenia przeprowadzono na myszach transgeniczných wytwarzających dwa rodzaje białka CagA: typ dziki lub białko nieulegające fosforylacji. Wykazano, iż dzika postać białka CagA przyczynia się do zmiany fenotypu tkanek nabłonkowych, co prowadzi do nowotworów żołądka, jelita cienkiego i układu odpornościowego. Nie zaobserwowano natomiast powyższych zmian u myszy, które wytwarzały nieufosforylowane białko CagA. Za pomocą modeli mysich udokumentowano, że białko CagA jest onkoproteina, jak również potwierdzono ważną funkcję procesu fosforylacji w powstawaniu zmian fenotypowych komórek nabłonkowych [20].

Użycie szczepu myszy C57BL/6 pozwoliło udokumentować, że po doustnym podaniu zawiesiny *H. pylori*, bakterie te przedostają się do wątroby, czego rezultatem są wieloogniskowe zmiany zapalne w tym narządzie. Przeprowadzone w ostatnim czasie badania na modelach mysich i szczurzych wskazują, że pałeczki *H. pylori* są niezależnym czynnikiem etiologicznym marskości wątroby [36].

Początkowym założeniem badań nad szczepionką przeciwko pałeczkom *Helicobacter* był udział przeciwciał klasy IgA w zapobieganiu lub wyciszeniu tego zakażenia. Chociaż wiele modeli zwierzęcych (fretki, koty, ssaki naczelne) było wykorzystanych w badaniach nad szczepionkami, dopiero zastosowanie różnego typu myszy knock-out pozwoliło na wyjaśnienie prawdopodobnych mechanizmów odpornościowych indukowanych przez szczepionkę. Wykorzystując myszy knock-out niewytwarzające przeciwciał klasy IgA stwierdzono, że protekcyjne działanie doustnej szczepionki nie wymaga ich obecności. Natomiast na powierzchni błony śluzowej wykryto kompensacyjne poziomy przeciwciał klasy IgM. Co więcej, Nedrud i wsp. wykorzystując do badań myszy z niedoborem limfocytów B (szczep WMT) wykazali, że działanie ochronne przeciwko *H. pylori* nadal występuje

pomimo całkowitego braku przeciwciał. Dalsze doświadczenia wskazały na rolę limfocytów T CD4+ oraz cytokin (IL-4, IFN- γ) w mechanizmach protekcji. Mimo, że nie opisano w jaki sposób komórki T pośredniczą w odporności na zakażenie *H. pylori*, to wykazano znaczenie powstających dzięki inżynierii genetycznej zwierząt do opracowania szczepionki przeciwko *H. pylori* [26].

Albinotyczny szczep wsobny myszy – BALB/c okazał się pomocny w ocenie skuteczności nowej profilaktycznej i terapeutycznej szczepionki epitopowej CTB-UA przeciwko *H. pylori*. Guo i wsp. skonstruowali wspomnianą szczepionkę na bazie adiuwantu w postaci podjednostki B toksyny cholery (CTB) oraz epitopu (UreA₁₈₃₋₂₀₃), będącego podjednostką A ureazy *H. pylori*. Badania przeprowadzone na myszach dały zadowalające wyniki. Wytwarzanie swoistych przeciwciał IgG, IgA oraz wydzielniczych sIgA jest pożądaną reakcją immunologiczną w odpowiedzi na szczepionki przeciwko *H. pylori*. Dlatego warto prowadzić dalsze badania nad oceną skuteczności szczepionki, w kontekście innych adiuwantów oraz różnych dróg podawania z użyciem nowych modeli zwierzęcych [13].

SZCZURY

W pierwszych badaniach na szczurach, zwierzętom wolnym od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów (germ free) podawano doustnie zawiesinę *H. felis*, co po 2-8 tygodniach wywołało stosunkowo łagodne zapalenie żołądka. Szczepy *H. pylori* cagA(+)/vacA(+) oraz cagA(-)/vacA(-) indukowały jedynie łagodne bądź umiarkowane zapalenie, natomiast nawet po roku od zakażenia nie obserwowano atrofii błony śluzowej żołądka [43].

Ross i wsp. stwierdzili, że wywołanie zakażenia *H. pylori* wymaga uprzedniego uszkodzenia błony śluzowej żołądka. Badacze użyli do tego celu kwasu octowego. Wykazali, że podanie zwierzętom zawiesiny *H. pylori* opóźnia gojenie się wrzodów powstałych na skutek działania kwasu octowego. W innych badaniach wykazano, że owe opóźnienie gojenia się wrzodów jest wywołane zwiększonym wytwarzaniem mediatorów stanu zapalnego oraz redukcją mikrokrażenia żołądkowego w części brzegowej wrzodu, wywołanego działaniem kwasu octowego. Kwiecień i wsp., aby uszkodzić błonę śluzową żołądka szczura i umożliwić jej zakażenie przez *H. pylori*, wykorzystali działanie 30-minutowej ischemii (niedokrwienie miejscowe) z następującej po niej 60-minutowej reperfuzji (przywrócenie krążenia). W ten sposób wykazali, że po zastosowaniu takich zabiegów, szczury mogą być skutecznie zakażone zarówno przez szczepy *H. pylori* cagA(+)/vacA(+), jak i *H. pylori* cagA(-)/vacA(-). Wyższy stopień zakażenia odnotowano w przypadku podania szczepu *H. pylori* cagA(+)/vacA(+). Na podstawie szybkiego testu ureazowego potwierdzono obecność pałeczek *H. pylori* w nabłonku już po 3 godzinach. W badaniach histopatologicznych wykazano, że między pierwszym a trzecim dniem zachodziła transformacja powierzchniowych nadzerek we wrzody trawienne, mające wyraźne brzegi i sięgające aż do blaszki mię-

śniowej śluzówki. Zaobserwowano również wzrost stężenia cytokin: IL-1 β oraz TNF- α , które odgrywają ważną rolę w przebiegu zapalenia żołądka wywołanego przez *H. pylori*. Interleukina 1 β istotnie obniżała wydzielanie kwasu solnego. Po podaniu zawiesiny *H. pylori* efekt ten był znacznie przedłużony (do 15 dni). Uważa się, że zjawisko to może ułatwić rozprzestrzenianie się pałeczek *H. pylori*, podobnie jak się to dzieje u ludzi, u których zaraz po zakażeniu występuje ostre zapalenie śluzówki żołądka. Zastosowanie modelu tworzenia uszkodzeń typu „ischemia-reperfuzja” potwierdza, że podczas zakażenia *H. pylori* wzrasta wytwarzanie gastryny, któremu towarzyszy spadek wydzielania somatostatyny przez komórki D. Przyczyną takich zmian może być wzrost stężenia IL-1 β (silny stymulator wydzielania gastryny), a także amoniaku, który uszkadzając komórki okładzinowe błony śluzowej żołądka powoduje zmniejszenie wydzielania kwasu żołądkowego, na co odpowiedzią jest wzrost stężenia gastryny. Ponadto zakażenie *H. pylori* zmniejsza lokalne wydzielanie somatostatyny, wzmagając wytwarzanie gastryny przez komórki G i w konsekwencji powstanie hipergastrynemii. N-metylohistamina uwalniana przez bakterie również działa pobudzająco na komórki G [21].

Kwiecień i wsp. podjęli próbę eradykacji pałeczek *H. pylori*, wykorzystując szczury poddane ischemii/reperfuzji. Tygodniowe podawanie klasycznej terapii trójlekowej przeciwko *H. pylori* z zastosowaniem: klarytromycyny, omeprazolu i tynidazolu, w pełni niwelowało opóźnienie gojenia się wrzodów, co zostało potwierdzone ujemnymi wynikami szybkiego testu ureazowego. Opracowany model szczura może być wykorzystany do sprawdzenia skuteczności nowych metod eradykacji *H. pylori*. Umożliwia również obserwowanie w jaki sposób pałeczki *H. pylori* wpływają na zmiany parametrów czynnościowych żołądka (wydzielanie kwasu solnego, gastryny, pepsyny, przepływ krwi) [21].

MYSZOSKOCZKI MONGOLSKIE

Hirayama i wsp. w 1996 r. wywołali przewlekłe zakażenie *H. pylori* u myszokoczków mongolskich (suwaków mongolskich), które od tego czasu są wykorzystywane jako model w badaniach nad etiopatogenezą zakażenia *H. pylori* [25]. Wśród ograniczeń zastosowania tego modelu wymienia się: słabą znajomość cech genetycznych, fizjologii żołądka, mikroflory przewodu pokarmowego, małą dostępność odczynników immunologicznych, jak również możliwość naturalnego zakażenia takich zwierząt bakteriami z rodzaju *Helicobacter*. Jednak ze względu na niewielkie rozmiary zwierzęcia, dobrą podatność na doświadczalne zakażenia *H. pylori*, szybko pojawiające się zapalenie żołądka i rozwój odpowiedzi immunologicznej oraz długotrwałą kolonizację spiralnymi pałeczkami, myszokoczekki są uznawane przez wielu badaczy za najlepszy model w badaniach nad takim zakażeniem. Udo- wodniono, że po 26 tygodniach od zakażenia *H. pylori*, rozwija się u tych zwierząt metaplasja jelitowa, natomiast po 62 tygodniach – gruczolakorak żołądka [41,44].

Białka szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 60 kDa (heat shock proteins, HSP60) oraz antygeny Lewis (Le) *H. pylori* przyczyniają się do wytwarzania autoantyprzeciwciał. Nakagawa i wsp. u myszokoczków zakażonych *H. pylori* zbadali w jaki sposób patogen ten przyczynia się do rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej. Zbadano relację między zmianami histopatologicznymi w żołądku, a mianem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom Lewis i HSP60. Po dwóch miesiącach od zakażenia zwierząt miano przeciwciał przeciwko powierzchniowym antygenom lub sonikatom uzyskanych z pałeczek *H. pylori* znacznie wzrosło. Stawiana jest hipoteza, że zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka jest związane z wytwarzaniem autoantyprzeciwciał. Uważa się ponadto, że białka HSP60 są zaangażowane w indukcję zapalenia i pośredniczą w procesach autoimmunologicznych oraz wytwarzaniu IL-6, która pobudza procesy zapalne. Antygeny LeX i LeY, będące składnikami lipopolisacharydu *H. pylori*, wykazują podobieństwo strukturalne do antygenów obecnych na erytrocytach i komórkach okładzinowych gospodarza, co stwarza możliwość interakcji przeciwciał indukowanych przez białka bakteryjne z antygenami gospodarza [25].

Model myszokoczka mongolskiego jest pomocny w badaniu czynników predysponujących do rozwoju procesu kancerogenezy podczas zakażenia *H. pylori*. Wykazano, iż jest on jedynym modelem zakażenia *H. pylori*, w którym metaplasja jelitowa jest najbardziej zbliżona do zmian wywołanych przez te drobnoustroje u człowieka. Inne zmiany towarzyszące zakażeniu *H. pylori*, tj. dysplazja i guz dobrze zróżnicowany, obserwowane w tym modelu, czynią go jeszcze bardziej interesującym z punktu widzenia badań nad rozwojem raka żołądka [15].

ŚWINKI MORSKIE

W ostatnich latach powszechnie stosowanym modelem eksperymentalnym imitującym zakażenie *H. pylori* u ludzi jest model świnki morskiej (*Cavia porcellus*). Jest to atrakcyjne zwierzę laboratoryjne z powodu niewielkich rozmiarów oraz łatwej hodowli. Żołądek świnki morskiej przypomina pod względem anatomicznym i fizjologicznym żołądek człowieka, i prawdopodobnie jest to jedyne z małych zwierząt doświadczalnych, których żołądek jest całkowicie pokryty przez nabłonek gruczolowy, a skład gruczolów żołądkowych jest zbliżony do ludzkich [41]. Po zakażeniu *H. pylori* szybko rozwija się stan zapalny błony śluzowej żołądka, możliwy do potwierdzenia badaniami histologicznymi [16]. W pionierskich badaniach Marshalla i wsp. wykazano, że podanie zawiesiny żywych pałeczek *H. pylori* ochotnikom już po 10 dniach indukowało łagodne zapalenie błony śluzowej żołądka. U świnek morskich obserwowano także podobny początek przebiegu reakcji zapalnej [40]. Komórki nabłonkowe żołądka świnek morskich wykazują poza tym ekspresję homologu ludzkiej cytokiny prozapalnej IL-8, aktywującej neutrofile [22]. Zakażenie *H. pylori* u świnek morskich może prowadzić do ostrego zapalenia żołądka typu B (sprzyjającemu chorobie nowotworowej) [42]. Ważne

jest, że nie odnotowano naturalnego zakażenia świnek morskich pałeczkami z rodzaju *Helicobacter* [41].

Wśród ssaków jedynie naczelne i świnki morskie wymagają diety bogatej w witaminę C. Wynika to z braku wytwarzania oksydazy L-gulonolaktonowej, enzymu zaangażowanego w syntezę kwasu askorbinowego z glukozy. W związku z tym codziennie trzeba im dostarczać tej ważnej witaminy o działaniu antyoksydacyjnym. U świnek morskich, podobnie jak u ludzi, stężenie witaminy C jest około pięciokrotnie wyższe w soku żołądkowym niż w osoczu. Stężenie witaminy C w soku żołądkowym wzrasta po jej dożylnym podaniu ochotnikom zdrowym w odróżnieniu od osób z zapaleniem błony śluzowej żołądka. A zatem wydzielanie kwasu askorbinowego wydaje się osłabione u osób zakażonych *H. pylori*. Małe stężenie witaminy C może zwiększać ryzyko rozwoju raka żołądka. Correa i wsp. wysunęli hipotezę, że kwas askorbinowy może działać jako przeciwutleniacz i tzw. zmiatacz wolnych rodników, a tym samym chronić przed powstawaniem rakotwórczych nitrozoamin i uszkodzeniem DNA przez reaktywne formy tlenu [38].

Shomer i wsp. udokumentowali, że błona śluzowa żołądka świnek morskich może podlegać kolonizacji przez pałeczki *H. pylori*. Po 4 tygodniach od zakażenia, badacze wykazali znaczące zapalenie błony śluzowej żołądka okolicy przedodźwiernikowej (antrum) oraz trwałą kolonizację utrzymującą się przez co najmniej 15 tygodni. W błonie śluzowej ponadto stwierdzono nacieki zapalne utworzone z mieszanej populacji limfocytów, makrofagów i komórek wielojądrowych, z dużą liczbą eozynofiliów, co jest wynikiem chemotaktycznego działania IL-8 (tak jak u ludzi) [38]. Inni badacze sprowokowali ostre przewlekłe zapalenie części antralnej żołądka w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori*, które utrzymywało się przez 5 miesięcy. Aby móc ocenić potencjał świnki morskiej jako modelu raka żołądka, konieczne jest wywołanie przewlekłego zakażenia trwającego przez rok lub dłużej [41].

W czasie zakażenia *H. pylori* może dochodzić do znacznej koncentracji antygenów tego drobnoustroju w kale. Duże wydzielania kwasów trawiennych w przewodzie pokarmowym świnek morskich może się przyczynić do rozkładu DNA i antygenów bakterii, co uniemożliwia wykrywanie *H. pylori* w kale. Dodatkowo potwierdzono powyższe wyjaśnienie tym, że po 24 h od podania zwierzętom dużej dawki *H. pylori* nie wykryto komponentów tych bakterii w kale. Immunoenzymatyczne testy kałowe wykrywające antygeny *H. pylori* (np. białko CagA) oraz technika semi-nested PCR są przydatne do wykrywania tych bakterii w kale myszy [41].

Poziom ochrony immunologicznej przeciwko zakażeniu *H. pylori* może być różny między gatunkami ssaków, pomimo zastosowania podobnych antygenów i adiuwantów. Należy sądzić, że zrozumienie międzygatunkowych różnic w odpowiedzi na immunizację będzie pomocne w opracowaniu skutecznych preparatów szczepionkowych. Keenan i wsp. szczepili donosowo myszy i świnki

morskie z użyciem rekombinowanej lipoproteiny 20 lub zewnętrznych pęcherzyków błonowych *H. pylori* (outer membrane vesicles, OMV). Jako adiuwantu użyli toksyny cholery (cholera toxin, CT). Jednak szczepionka z użyciem OMV i CT chroniła jedynie myszy, a nie świnki morskie [16]. Szczepione myszy wytwarzały przeciwciała klasy IgG1, natomiast świnki morskie – IgG2. Obserwacje te wskazują, że układ immunologiczny obydwu gryzoni inaczej reaguje na CT lub jest to związane z drogą podawania szczepionki. Durrani i wsp. donoszą, że doustne szczepienia sonikatami *H. pylori* oraz CT pobudzają ogólną i miejscową odpowiedź immunologiczną świnek morskich. Skład preparatu szczepionkowego jest również ważny jak wybór drogi podawania do opracowania skutecznej szczepionki przeciwko *H. pylori* [9].

Świnki morskie i chomiki są powszechnie stosowane do badań przewlekłych zakażeń bakteryjnych, uwzględniając *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*. Jednak podatność na reakcję zapalną, w tym aktywację dopełniacza, czyni świnkę morską idealnym zwierzęciem w opracowaniu modelu zakażenia *H. pylori* [42].

SSAKI Z RODZAJU NACZELNYCH

Duży wkład w poznanie związku między zakażeniami *H. pylori* a chorobami żołądka może wnieść opracowanie modeli badawczych, z wykorzystaniem ssaków naczelnych. Anatomia i fizjologia tych zwierząt jest najbardziej zbliżona do cech ludzi. Nawyki żywieniowe oraz budowa żołądka również są bardzo podobne. Długa żywotność tych zwierząt (średnio 10-20 lat) pozwala na długotrwałą obserwację zmian chorobowych, wykonywanie endoskopii, powtarzanie badań histopatologicznych żołądka za pomocą biopsji czy ostatecznie na resekcję żołądka. Powyższe cechy sprawiają, iż zwierzęta naczelne są szczególnie interesujące, zwłaszcza w badaniach nad czynnikami bakteryjnymi czy podatnością gospodarza na zakażenie, które wpływają na kolonizację lub powstanie i progresję choroby żołądka. Zwierzęta, u których powiodła się eksperymentalna transmisja pałeczek *H. pylori* to szympansy (*Pan troglodytes*), a także gatunki małp z rodziny makakowatych: makak jawański (*Macaca fascicularis*), makak japoński (*M. fuscata*) i makak rezus (*M. mulatta*) [17].

Kodama i wsp. opracowali model makaka japońskiego, u którego długotrwałe zakażenie *H. pylori* wywołało zaniżone zapalenie żołądka oraz mutację w genie p53. Do doświadczenia wykorzystano cztery szczepy kliniczne *H. pylori*, wyizolowane od pacjentów z wrzodami żołądka lub dwunastnicy. Zwierzęta przed podaniem zawiesiny bakteryjnej *H. pylori* (10^9 CFU/ml) otrzymały doustnie ampicylinę w celu uprzedniej eradykacji spiralnych bakterii innych niż *H. pylori*. Tydzień po inokulacji, u wszystkich zakażonych zwierząt pojawiło się ostre zapalenie błony śluzowej żołądka z towarzyszącymi obrzękami i znacznym zaczerwienieniem. Te wyniki są zgodne ze zmianami obserwowanymi u ludzi zakażonych *H. pylori*.

Zakażenie objętych doświadczeniem małp było rozpoznawane i zarazem potwierdzane przez: hodowlę, szybki test ureazowy, badania histologiczne oraz podwyższony poziom swoistych przeciwciał IgG skierowanych przeciwko *H. pylori* w osoczu. W obrzękniętej blaszce właściwej nabłonka żołądka zaobserwowano znaczną infiltrację monocytów i leukocytów wielojądrazstych, co jest charakterystyczne dla wczesnej fazy zakażenia. Po sześciu miesiącach od zakażenia, wysokość odźwiernika znacznie się obniżyła u zwierząt zakażonych w porównaniu z kontrolnymi. W ciągu pięcioletniej obserwacji odnotowano natomiast stopniowe postępowanie zmian zanikowych w nabłonku żołądka. Te wszystkie procesy wskazują, że dużą rolę w zanikowym zapaleniu żołądka u badanych makaków japońskich odgrywa *H. pylori*. Ponadto w zależności od czasu trwania zakażenia zaobserwowano, że wraz ze wzrostem atrofii błony śluzowej żołądka wzrastała liczba mutacji punktowych w genie p53. Należy podkreślić, że zmiany genetyczne w genie p53 bardzo rzadko występują u małp niezakażonych *H. pylori*. Model makaka japońskiego może okazać się pomocny w wyjaśnieniu potencjalnych mechanizmów wykorzystywanych przez pałeczki *H. pylori* w przebiegu zdarzeń prowadzących do raka żołądka. Pozwala również prześledzić zależność między długotrwałym zakażeniem *H. pylori* a stopniowymi zmianami błony śluzowej żołądka [17].

Spośród wielu badanych gatunków naczelnych, najbardziej obiecujące w śledzeniu przebiegu zakażeń *H. pylori* wydają się makaki rezus (*M. mulatta*) ze względu na ich ogólnosiatową dostępność, umiarkowane rozmiary, a także duży zestaw odczynników do badań immunologicznych oraz podstawową wiedzę zdobytą przez wiele lat badań. Ponad połowa makaków rezus ulega naturalnemu zakażeniu przez pałeczki *H. pylori*. Częstość takich zakażeń jest podobna do występujących u ludzi, szczególnie w krajach rozwijających się. Należy również zauważyć, że u makaków rezus zakażonych *H. pylori* dochodzi do atrofii, powstawania mikroskopijnych nadżerek, a także utraty śluzu, rozwoju wrzodów trawiennych i raka żołądka, co przypomina objawy i następstwa ludzkiej choroby wrzodowej. Te objawy dowodzą, że makaki rezus mogą się okazać szczególnie ważne w badaniach fizjologii żołądka i reakcji odpornościowych powstających w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori*. Badania prowadzone przez Dubois i wsp. wykazały, że małpy różnią się podatnością na zakażenie przez różne szczepy *H. pylori*, gdyż bakterie mają odmienne cechy, pełniące rolę w procesie kolonizacji poszczególnych gospodarzy. Z tego względu niektóre zakażenia mogą być bardzo krótkotrwałe. Przypuszcza się, że olbrzymia różnorodność szczepów *H. pylori* odzwierciedla zróżnicowanie genetyczne gospodarzy, a przez to ich podatność na zakażenie. A zatem szczepienie rebusów, dobrze scharakteryzowanych pod względem genetycznym, oraz analiza poziomu DNA odzyskanych szczepów, powinny wnieść nowe spojrzenie na mechanizmy, wskutek których *H. pylori* wywołuje choroby żołądka i dostosowuje się do określonego gospodarza podczas trwania przewlekłego zakażenia [7].

Trwałe zakażenie *H. pylori* można wywołać u makaków rezus przez podanie takich bakterii, wyizolowanych od ludzi. Klasyczna potrójna terapia (dwa razy dziennie: metronidazol, amoksylicyna i salicylan bizmutu) tylko w 60% jest skuteczna. Leczenie oparte na podawaniu omeprazolu i klarytromycyny daje lepsze działanie protekcyjne. Mimo, że wykorzystanie tych małp jest ograniczone ze względu na konieczność specjalistycznej opieki, udział makaków rezus w opracowaniu szczepionki przeciwko *H. pylori* wydaje się istotny. W związku z tym, że model rebusa naturalnie nabywa zakażenia *H. pylori* został wybrany przez Dubois i wsp. do oceny bezpieczeństwa i skuteczności szczepionki, zawierającej rekombinowaną ureazę (rUre) w połączeniu z termolabilną enterotoksyną (LT) *Escherichia coli* jako adiuwantem. Naukowcy wykazali, że szczepionka ta chroni przed zakażeniem *H. pylori*. Zastosowany adiuwant ponadto okazał się skuteczniejszy i mniej toksyczny u ssaków niż toksyna cholery (CT). Po podaniu szczepionki rozwinęła się silna odpowiedź humoralna (przeciwciała IgG). Nie odnotowano również żadnych działań niepożądanych (biegunka, wymioty, spadek wagi ciała). Uzyskane wyniki pozwalają sugerować, że podobna immunoprofilaktyka będzie mogła być stosowana u ludzi [8].

PODSUMOWANIE

Modele zwierzęce zakażenia *H. pylori* od wielu lat dostarczają nowych informacji na temat mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej, są również pomocne w opracowaniu nowych metod leczenia, a także umożliwiają przewidywanie niekorzystnych skutków ich działania. Jednak, mimo wielu podobieństw między wywołanymi zmianami patologicznymi, należy pamiętać o istotnych różnicach w budowie i funkcji układu immunologicznego u zwierząt i u ludzi. Idealny model zwierzęcy odtwarzający ludzką chorobę nie został dotychczas opracowany. Każdy z przedstawionych modeli zwierzęcych ma swoje wady i zalety, a wybór modelu zwierzęcego zależy od celów doświadczenia (tab. 2).

Określenie pełnego wpływu czynników zależnych od gospodarza na rozwój raka żołądka wywołanego przez *H. pylori* wymaga użycia modeli zwierzęcych, które wciąż dostarczają cennych informacji na temat czynników bakteryjnych i środowiskowych zaangażowanych w kancerogenezę żołądka. Dotychczasowe osiągnięcia związane z odkryciem nowych gatunków *Helicobacter* podkreślają potrzebę kontynuacji intensywnych badań nad tą grupą bakterii. Badania nad związkiem *H. pylori* z przewlekłym zapaleniem żołądka u zwierząt mogą dostarczyć nowych informacji na temat roli tych bakterii w patogenezie raka żołądka, chłoniaków żołądka, choroby żołądka i dwunastnicy. Należy uwzględnić, że szczepionki, które u zwierząt prowadziły do zahamowania rozwoju lub nawet wyleczenia choroby wrzodowej, u ludzi mogą pozostawać bez wpływu, a nawet pogarszać przebieg choroby.

Tabela 2. Modele zwierzęce imitujące zakażenie *H. pylori* u ludzi

Model zwierzęcy	Zalety	Wady	Zmiany odzwierciedlające chorobę wrzodową człowieka
Świnie gnotobiotyczne	pomocne w badaniu czynników wirulencji podobne do opisanych u ludzi: fizjologia żołądka miejsca kolonizacji żołądka	żołądek zasiedlany przez kilka gatunków <i>Helicobacter</i> słaba aktywacja neutrofilów duże koszty związane z użyciem specjalnego sprzętu do uzyskania świń gnotobiotycznych	wrzody żołądka
Psy	wzmoczona ekspresja IL-8 duża liczba neutrofilów	liczne zakażenia naturalne wywołane przez kilka gatunków <i>Helicobacter</i> konieczność stosowania metod inwazyjnych	przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka grudki chłonne w części astralnej żołądka → prekursor MALT
Koty	długoterminowe zakażenie <i>H. pylori</i> (koty jako rezerwuuar bakterii)	liczne zakażenia naturalne wywołane przez kilka gatunków <i>Helicobacter</i> dodatkowe koszty związane z hodowlą kotów wolnych od patogenów (SPF)	przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka
Myszy	duża dostępność odczynników nieskomplikowana, tania hodowla duża liczba młodych w miocie duże podobieństwo genomu z ludzkim modyfikacje genetyczne (transgeneza, metoda knock-out) umożliwiają zbadanie poszczególnych aspektów zakażenia oraz opracowanie szczepionek	bardzo niski stopień kolonizacji błony śluzowej żołądka następstwo zakażenia <i>H. pylori</i> w postaci nowotworu żołądka jest trudne do oceny	jedynie przejściowe zapalenie błony śluzowej żołądka wielogniskowe zmiany zapalne w wątrobie (szczep myszy C57BL/6)
Szczury	możliwość obserwacji wpływu bakterii na parametry czynnościowe żołądka za pomocą modelu tworzenia uszkodzeń (ischemii/reperfuzji)	bardzo niski stopień kolonizacji błony śluzowej żołądka	łagodne/umiarkowane zapalenie żołądka
Myszokoczki mongolskie	dobra podatność na doświadczalne zakażenie <i>H. pylori</i> szybkie zapalenie błony śluzowej żołądka długotrwała kolonizacja <i>H. pylori</i>	słaba znajomość genetyki, fizjologii żołądka, mikroflory przewodu pokarmowego mała dostępność odczynników możliwość naturalnego zakażenia bakteriami z rodzaju <i>Helicobacter</i>	przewlekłe aktywne zapalenie błony śluzowej żołądka metaplasja jelitowa gruczolakorak żołądka odpowiedź autoimmunologiczna
Świnki morskie	niewielkie rozmiary łatwa hodowla anatomia i fizjologia żołądka podobna do ludzkiego żołądek całkowicie pokryty nabłonkiem gruczołowym podatność na doświadczalne zakażenie <i>H. pylori</i> szybko rozwija się stan zapalny, w tym aktywacja dopełniacza, po zakażeniu <i>H. pylori</i> ekspresja homologu IL-8 przez komórki nabłonkowe żołądka długotrwała kolonizacja <i>H. pylori</i> (5-miesięczna) brak naturalnego zakażenia bakteriami z rodzaju <i>Helicobacter</i> wymóg diety bogatej w witaminę C (tak jak u ludzi)	mała dostępność odczynników wysoki poziom trawienia przewodu pokarmowego utrudnia możliwość badania antygenów <i>H. pylori</i> w odchodach	przewlekłe aktywne zapalenie błony śluzowej żołądka w antrum żołądka ostre zapalenie żołądka typu B (prowadzące do zmian nowotworowych)
Ssaki naczelne	anatomia i fizjologia żołądka najbardziej podobna do ludzkiego nawyki żywieniowe podobne do ludzkich długa żywotność (obserwacja zmian zapalnych, wykonywanie endoskopii, powtarzanie badań) umiarkowane rozmiary duży zestaw odczynników do badań	ograniczenia ze względu na specjalistyczną opiekę	ostre zapalenie błony śluzowej żołądka z towarzyszącymi obrzękami wrzody trawienne atrofia błony śluzowej żołądka

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bederska D.: Zastosowanie techniki nokautu genowego, analizy sekwencji mikrosatelitarnych oraz szczepów wsobnych myszy w mapowaniu genów odpowiedzialnych za spermatogenezę. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 2011; 38: 11-20
- [2] Biernat M., Gościński G.: Gatunki *Helicobacter* izolowane z przewodu pokarmowego człowieka. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 113-120
- [3] Biernat M., Gościński G.: Rola *Helicobacter hepaticus* w chorobach wątroby i dolnego odcinka przewodu pokarmowego. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003; 12: 785-789
- [4] Chichłowski M., Hale L.P.: Effects of *Helicobacter* infection on research: the case for eradication of *Helicobacter* from rodent research colonies. *Comp. Med.*, 2009; 59: 10-17
- [5] Chmiela M., Czkwianiec E., Wadstrom T., Rudnicka W.: Role of *Helicobacter pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages. *Gut*, 1997; 40: 20-24
- [6] Chmiela M., Rudnicka W.: Reakcje immunologiczne w zakażeniach wywołanych przez *Helicobacter pylori*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1997; 51: 115-138
- [7] Dubois A., Berg D.E., Inceci E.T., Fiala N., Heman-Ackah L.M., Perez-Perez G.I., Blaser M.J.: Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 2885-2891
- [8] Dubois A., Lee C.K., Fiala N., Kleantous H., Mehlman P.T., Monath T.: Immunization against natural *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4340-4346
- [9] Durrani Z., Rijpkema S.: Orogastric vaccination of guinea pigs with *Helicobacter pylori* sonicate and a high dose of cholera toxin lowers the burden of infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003; 36: 169-173
- [10] Gościński G.: Rodzaj *Helicobacter* – implikacje kliniczne i narastający problem oporności *Helicobacter pylori*. *Pediatrica Współcz. Gastroenterol. Hepatol. Żywnienie Dziecka*, 2010; 12: 41-44
- [11] Gościński G., Biernat M., Kubiak K., Pawlus K., Grabińska J., Jankowski M.: Przeciwciała w zakażeniach *Helicobacter* spp. u psów. *Med. Wet.*, 2008; 64: 903-905
- [12] Grębowska A., Moran A.P., Bielański W., Matusiak A., Rechciński T., Rudnicka K., Baranowska A., Rudnicka W., Chmiela M.: *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocyte cultures. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010; 61: 437-442
- [13] Guo L., Liu K., Xu G., Li X., Tu J., Tang F., Xing Y., Xi T.: Prophylactic and therapeutic efficacy of the epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* infection in a BALB/c mice model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012; 95: 1437-1444
- [14] Harbour S., Sutton P.: Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008; 122: 191-203
- [15] Honda S., Fujioka T., Tokieda M., Satoh R., Nishizono A., Nasu M.: Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res.*, 1998; 58: 4255-4259
- [16] Keenan J.I., Rijpkema S.G., Durrani Z., Roake J.A.: Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003; 36: 199-205
- [17] Kodama M., Murakami K., Sato R., Okimoto T., Nishizono A., Fujioka T.: *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2005; 11: 7063-7071
- [18] Książczyńska D., Szandruk M., Szeląg A.: Perspektywy leczenia zakażenia *Helicobacter pylori*. *Przegląd Gastroenterol.*, 2012; 7: 70-77
- [19] Kubiak K.: Kolonizacja błony śluzowej żołądka psów i kotów drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* – aspekt kliniczny. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 2006
- [20] Kuklińska U., Łasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Białko CagA *Helicobacter pylori* – pierwsza zidentyfikowana bakteryjna onkoproteina. *Postępy Mikrobiol.*, 2011; 50: 97-106
- [21] Kwiecień S., Brzozowski T., Śliwowski Z., Konturek S.J.: Infekcja *Helicobacter pylori* w doświadczalnym modelu uszkodzeń błony śluzowej żołądka powstałych w wyniku ischemii i reperfuzji. *Gastroenterol. Pol.*, 2001; 8: 111-125
- [22] Lee A.: Animal models of *Helicobacter* infection. *Mol. Med. Today*, 1999; 5: 500-501
- [23] Marshall B.J., Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984; 1: 1311-1315
- [24] Merwid-Łąd A., Trocha M., Książczyńska D., Sozański T., Szeląg A.: Animal models for the gastrointestinal motility evaluation. *Gastroenterol. Pol.*, 2009; 16: 201-206
- [25] Nakagawa S., Osaki T., Fujioka Y., Yamaguchi H., Kamiya S.: Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005; 12: 347-353
- [26] Nedrud J.G.: Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1999; 24: 243-250
- [27] Neiger R., Simpson K.W.: *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J. Vet. Intern. Med.*, 2000; 14: 125-133
- [28] Pautahidis T., Tsangaris T., Kanakoudis G., Vlemmas I., Iliadis N., Sofianou D.: *Helicobacter pylori*-induced gastritis in experimentally infected conventional piglets. *Vet. Pathol.*, 2001; 38: 667-678
- [29] Paziak-Domańska B., Chmiela M., Jarosińska A., Rudnicka W.: Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell. Immunol.*, 2000; 202: 136-139
- [30] Peek R.M.: *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Dis. Model. Mech.*, 2008; 1: 50-55
- [31] Radziejewska I.: Rola mucyn żołądkowych w oddziaływaniach z *Helicobacter pylori*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 60-66
- [32] Rand M.S.: Selection of biomedical animal models. W: Sourcebook of models for biomedical research, red.: P.M. Conn. Human Press, Totowa, NJ, 2008; 9-15
- [33] Rossi G., Rossi M., Vitali C.G., Fortuna D., Burrone D., Pancotto L., Capecchi S., Sozzi S., Renzoni G., Braca G., Giudice G., Rappuoli R., Ghiara P., Taccini E.: A conventional Beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 3112-3120
- [34] Rossi G., Ruggiero P., Peppoloni S., Pancotto L., Fortuna D., Lauretti L., Volpini G., Mancianti S., Corazza M., Taccini E., Di Pisa F., Rappuoli R., Del Giudice G.: Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 3252-3259
- [35] Rudnicka K., Włodarczyk M., Moran A.P., Rechciński T., Miszczyk E., Matusiak A., Szczepna E., Walencka M., Rudnicka W., Chmiela M.: *Helicobacter pylori* antigens as potential modulators of lymphocytes' cytotoxic activity. *Microbiol. Immunol.*, 2012; 56: 62-75
- [36] Rybicka M., Stalke P., Bielawski K.P., Nakonieczna J.: Zakażenia bakteriami rodzaju *Helicobacter* spp. w przewlekłym uszkodzeniu wątroby. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 386-395
- [37] Sapierzyński R., Fabisiak M., Kizerwetter-Świda M.: Nasilenie i charakterystyka zapalnego nacieku komórkowego w błonie ślu-

zowej żołądka świń przy zakażeniu *Helicobacter* sp. *Medycyna Wet.*, 2007; 63: 1102-1105

[38] Shomer N.H., Dangler C.A., Whary M.T., Fox J.G.: Experimental *Helicobacter pylori* infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 2614-2618

[39] Sjunnesson H.: *Helicobacter pylori*-induced gastritis in guinea pigs: model development, diagnostic methods and comparison with mouse protocols. Lund University, 2002; 1-70

[40] Sjunnesson H., Sturegard E., Grubb A., Willén R., Wadström T.: Comparative study of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs and mice – elevation of acute-phase protein C3 in infected guinea pigs. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2001; 30: 167-172

[41] Sjunnesson H., Sturegard E., Hynes S., Willén R., Feinstein R., Wadström T.: Five month persistence of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs. *APMIS*, 2003; 111: 634-642

[42] Sjunnesson H., Sturegard E., Willén R., Wadström T.: High intake of selenium, β -carotene, and vitamins A, C, and E reduces growth of *Helicobacter pylori* in the guinea pig. *Comp. Med.*, 2001; 51: 418-423

[43] Wang X.: *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. Development, optimization and inhibitory effects of antioxidants. Doctoral dissertation of Lund University, Sweden 2001

[44] Wirth H.P., Beins M.H., Yang M., Tham K.T., Blaser M.J.: Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4856-4866

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.