



Praca doktorska

Aktywność biologiczna antygenów powierzchniowych *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* CCDM 218 i *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 w złożonych interakcjach z organizmem gospodarza - profilaktyka/leczenie chorób alergicznych

Mgr Katarzyna Pacyga-Prus

Promotor

Dr hab. Sabina Górską, prof. IITD PAN



Przygotowana w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu

w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej

Polskiej Akademii Nauk

Wrocław 2024

Streszczenie

Alergia oddechowa to schorzenie objawiające się nadwrażliwością organizmu na nieszkodliwe cząsteczki zwane alergenami. Choroba ta należy do najczęstszych problemów zdrowotnych w krajach rozwiniętych. Wpływa nie tylko na jakość życia pacjentów, ale także na gospodarkę, zwiększając koszty opieki zdrowotnej i obniżając produktywność osób cierpiących na alergię. Chcąc skutecznie stawić czoła rosnącemu problemowi alergii oddechowej, konieczne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych metod leczenia. Dostępne terapie są często niewystarczające i mogą powodować liczne efekty uboczne. Najnowsze badania wykazują związek między mikrobiotą a ryzykiem wystąpienia alergii. Opisują również znaczenie szczepów *Bifidobacterium* w łagodzeniu objawów astmy. Okazuje się, że nie tylko żywe i proliferujące bakterie mogą korzystnie wpływać na zdrowie gospodarza. Cząsteczki efektorowe, metabolity produkowane przez bakterie, czy też jej fragmenty, znane jako postbiotyki, mogą wykazywać podobne lub lepsze właściwości niż mikroorganizm z którego pochodzą. Dzięki możliwości określenia ich struktury chemicznej, cząsteczki te są idealnymi kandydatami do szczegółowych badań funkcjonalnych. Co więcej, w przeciwieństwie do żywych organizmów, nie mogą przenosić genów oporności na antybiotyki ani wywoływać bakteriemii, co zwiększa bezpieczeństwo ich stosowania.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zbadano potencjał antygenów powierzchniowych produkowanych przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* CCDM 218 (Ban218) oraz *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad368). W pierwszej kolejności wyizolowano i oczyszczono antygeny powierzchniowe, do których należały peptydoglikan (PG, jeden na szczep), kwasy lipotejchojowe (LTA, jeden na szczep) oraz polisacharydy (PS) (B.PAT, PS 2, PS 3 dla Ban218 oraz BAP1, PS 2, PS 3 dla Bad368). Badanie wpływu antygenów na aktywność splenocytów wyizolowanych z myszy uwrażliwionych owoalbuminą (OVA) wykazało, że BAP1 ma największy potencjał w przywracaniu równowagi między limfocytami T pomocniczymi typu 1 (Th1) i 2 (Th2). Z tego powodu BAP1 poddano dalszym, szczegółowym analizom. Wykazały one efektywny transfer PS między komórkami nabłonkowymi a komórkami układu odpornościowego. Dokładna analiza chemiczna BAP1 pozwoliła określić nieopisaną wcześniej strukturę heksasacharydu, składającego się z reszt ramnozy, glukozy i galaktozy, tworzących PS o masie cząsteczkowej około 9.99×10^6 . Następnie, BAP1 testowano na myszach wolnych od drobnoustrojów (GF). Okazało się, że mimo ogólnego neutralnego wpływu PS na naiwny układ odpornościowy, był on w stanie zmniejszyć poziom ligandu chemokiny 2 (CCL2) i eotaksyny, jednocześnie zwiększając ekspresję *Rorc* w płucach. Co ciekawe, donosowe podanie BAP1 myszom uczulonym na OVA wywołało zarówno ogólnoustrojową, jak i lokalną odpowiedź organizmu. Przede wszystkim zmniejszyło ono

poziom specyficznej dla OVA immunoglobuliny (Ig) E w surowicy, jak i produkcję cytokin Th2 oraz IL-10 w splenocytach. W płucach, BAP1 zredukował zapalenie poprzez zahamowanie napływu eozynofiliów i makrofagów oraz ograniczenie produkcji cytokin IL-5, IL-13, IL-4 i IL-10. Analiza ekspresji genów powieliła wyniki uzyskane na myszach GF dotyczące wpływu BAP1 na ekspresję *Rorc*, choć wynik ten był statystycznie nieistotny. Potwierdziła również rolę testowanego PS w hamowaniu produkcji cytokiny IL-10, poprzez zmniejszenie ekspresji odpowiedzialnego za jej produkcję genu.

Spośród antygenów powierzchniowych Ban218, B.PAT okazał się najbardziej interesujący z powodu występowania w jego strukturze fosforu. Chcąc sprawdzić, czy określone modyfikacje PS mogą poprawić jego funkcję, B.PAT poddano defosforylacji. Wyniki pokazały, że zabieg ten zmienił strukturę przestrzenną PS, a co ważniejsze, zwiększył jego właściwości immunomodulujące, jak wykazano na badaniach z wykorzystaniem komórek dendrytycznych szpiku kostnego (BMDCs). Ponadto, defosforylacja skutkowała wzmocnieniem właściwości przeciwzapalnych B.PAT w modelu stanu zapalnego wywołanego interleukiną(IL)-1 β .

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcie przedstawione w tej rozprawie doktorskiej należy wskazać opisanie ogromnego potencjału BAP1 w łagodzeniu alergii dróg oddechowych. Jednakże, w przyszłości konieczne będą dalsze eksperymenty mające na celu dokładne zrozumienie jego mechanizmu działania. Niezbędne będą również badania kliniczne na ludziach, aby zweryfikować wyniki uzyskane w modelach mysich.