

2. Streszczenie

Oddychanie, jako jeden z podstawowych procesów fizjologicznych, umożliwia organizmom przeżycie. Jednakże, każdego dnia drogi oddechowe narażone są na działanie milionów bodźców tj. alergenów, bakterie, grzyby, wirusy czy zanieczyszczenia powietrza. Komórki odpornościowe organizmu warunkują właściwą odpowiedź na te czynniki (1). Utrzymują one optymalne funkcjonowanie naszego organizmu w ciągle zmieniających się warunkach zewnętrznych, utrzymując stan równowagi organizmu zwany homeostazą. Zaburzenie homeostazy dróg oddechowych prowadzi do rozwoju stanu zapalnego jakimi są np. alergie. Termin „alergia” obejmuje trzy najczęstsze choroby alergiczne: alergiczny nieżyt nosa (AR), alergię pokarmową (FA) i astmę. Alergie charakteryzują się reakcjami nadwrażliwości na nieszkodliwe dla organizmu cząsteczki. Według Światowej Organizacji Alergii (WAO) AR dotyczy około 40% światowej populacji, a astma około 334 milionów ludzi na całym świecie (2). Obie choroby mogą być wywołane podobnymi czynnikami jakimi są pyłki, roztocza kurzu domowego, pleśń lub wdychane białka występujące w żywności. Jednakże, na początku XX wieku został zaobserwowany korzystny wpływ mikroorganizmów na organizm ludzki (3). Probiotyki aktualnie są powszechnie stosowane przy antybiotykoterapii w celu uzupełnienia mikroflory bakteryjnej jelit i zapobiegania przerostu bakterii chorobotwórczych, a ich korzystny wpływ na wiele chorób jest niepodważalny (4). Bakterie probiotyczne mają zdolność łagodzenia objawów alergii sezonowych poprzez działanie na różne szlaki sygnałowe i odpowiedzi komórkowe istotne w rozwoju reakcji alergicznej.

Przedstawiona praca doktorska skupia się na odkryciu przeciwalergicznego właściwości szczepu *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 (B.370) oraz antygeny powierzchniowe, który odpowiada za te funkcje. W celu dokładnego określenia właściwości B.370 wyizolowano jego antygeny powierzchniowe: polisacharydy, peptydoglikan oraz białka powierzchniowe i określono ich potencjał przeciwalergicznego poprzez badanie poziomu cytokin produkowanych przez splenocyty izolowane z uwrażliwianych na owoalbuminę myszy. Na podstawie wyników wybrano białka powierzchniowe jako antygen powierzchniowy o najlepszych właściwościach przeciwalergicznym, najmocniej hamujący produkcję cytokin szlaku T2. Dla wyizolowanych antygenów scharakteryzowano również receptory odpowiadające za ich rozpoznawanie i odkryto, że peptydoglikan rozpoznawany jest przez receptory NOD2 i TLR2, natomiast polisacharydy oraz białka powierzchniowe aktywują receptor TLR2.

W kolejnym etapie zbadano właściwości białek powierzchniowych B.370 w mysich modelach, w celu opisanie ich właściwości. Mysi model alergii na owoalbuminę pokazał, że białka B.370 mają zdolność hamowania alergii w porównaniu z grupą myszy uczulonych poprzez zmniejszanie ilości komórek w BALF, w tym zmniejszanie ilości eozynofili. Białka B.370 łagodziły również stan zapalny w tkankach płuc, określony na podstawie badania skrawków histologicznych oraz obniżały produkcję IL-5 w komórkach płuc, czyli cytokiny szlaku T2. Dodatkowo, wyniki dotyczące

wydzielania cytokin przez splenocyty izolowane od myszy uczulonych na OVA oraz traktowanych białkami B.370 wskazały na przeciwalergiczne właściwości białek B.370, które zmniejszały ilość produkowanej cytokiny IL-13, która zaliczana jest do cytokin szlaku T2. W drugim modelu mysim, myszy wolnych od patogenów tzw. germ free, pokazano względną neutralność białek B.370 na rozwój układu odpornościowego myszy. Podawanie myszom wolnym od patogenów białek B.370 nie wpływało na ilość komórek w płucach oraz nie miało wpływu na obraz histologiczny skrawków płuc. Dodatkowo nie wzmacniało produkcji cytokin i chemokin prozapalnych z komórek płuc, jedynie powodując wzrost produkcji IL-12p70, która indukuje różnicowanie limfocytów Th1 oraz stymuluje również wydzielanie IFN- γ prowadząc do modulacji odpowiedzi immunologicznej. Podawanie białek B.370 okazało się być względnie neutralne również dla splenocytów izolowanych od myszy, w których białka B.370 powodowały jedynie wzrost cytokin IL-6 oraz TNF- α , kluczowych dla prawidłowego różnicowania naiwnych limfocytów T, przekształcania monocytów w makrofagi oraz regulacji prawidłowej odpowiedzi układu odpornościowego. Białka B.370 zwiększały również poziomy chemokin CCL5 oraz CCL3, związanych z rekrutacją komórek układu immunologicznego.

W celu określenia mechanizmu poprzez który białka B.370 hamują alergię, przeprowadzono badania z użyciem modelu aktywacji inflamasomu NLRP3 w linii komórkowej THP-1. Inflamasom NLRP3 odgrywa kluczową rolę w rozwoju chorób układu oddechowego o podłożu zapalnym, takich jak alergiczny nieżyt nosa, astma alergiczna i POChP, i znacznie zaostrza rozwój tych chorób. Jest to wielobiałkowy kompleks aktywujący kaspazę-1, która aktywuje interleukiny IL-1 β i IL-18 prowadząc do ich uwalniania. Wyniki z tego doświadczenia pokazały, że białka B.370 nie hamują alergii poprzez dezaktywację inflamasomu NLRP3 i nie mają wpływu na jego szlak aktywacji. Natomiast wykazano, że żywe bakterie *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 mają zdolność łagodzenia alergii poprzez hamowanie aktywacji inflamasomu NLRP3. Żywe bakterie *B. adolescentis* CCDM 370 mają zdolność hamowania ekspresji kaspazy-1, oraz wpływają na zmniejszenia produkcji białka IL-1 β oraz jego wydzielania. Wpływają one tym samym na kluczowe elementy szlaku inflamasomu NLRP3, hamując jego aktywację i prowadząc do łagodzenia objawów alergii.

Wyniki przedstawione w tej pracy potwierdzają probiotyczne działanie szczepu *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 oraz jego antyalergiczne właściwości. Co więcej, wskazują, że to białka powierzchniowe B.370 odpowiadają za część tych właściwości. Wyniki te stanowią podstawę do dalszych badań nad opracowaniem preparatów przeciwalergicznym opartych o antygeny powierzchniowe. Badania nad wpływem białek powierzchniowych B.370 na łagodzenie objawów alergii wymagają jednakże dalszych eksperymentów tj. określenie konkretnego białka, które odpowiada za właściwości przeciwalergiczne szczepu oraz poszukiwanie mechanizmu leżącego u podstaw obserwowanych właściwości.