

# Charakterystyka właściwości immunomodulujących *B. longum* spp. *longum* CCM 7952 w leczeniu chorób o podłożu alergicznym

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* należą do grupy mikroorganizmów określanych mianem bakterii pro-zdrowotnych dla organizmu człowieka. Ich obecność w układzie pokarmowym noworodka pozwala na prawidłowe dojrzewanie układu odpornościowego. W XXI wieku szerokie zastosowanie antybiotykoterapii oraz wysoko przetworzonej diety, zwłaszcza w krajach wysokorozwiniętych, przyczyniło się do spadku ilości i różnorodności szczepów bakteryjnych m.in. z rodzaju *Bifidobacterium* (Olm et al., 2022). Zaburzenia w składzie jakościowym i ilościowym mikroflory bakteryjnej prowadzą do zwiększonego prawdopodobieństwa wystąpienia zaburzeń na tle autoimmunologicznym czy metabolicznym. Do najczęściej obserwowanych chorób zalicza się alergię, chroniczne zapalenie zatok, nieswoiste zapalenie jelit, otyłość i cukrzycę (Milani et al., 2017b). **Według Światowej Organizacji Alergii (WAO) ilość osób cierpiących z powodu chorób o podłożu alergicznym sięga już 40% światowej populacji** (Agache et al., 2019). Istotne jest zatem prowadzenie badań nad nowymi metodami leczenia chorób o podłożu alergicznym. Jednym z takich podejść jest prowadzenie badań nad zwiększeniem różnorodności mikroflory, która stymuluje kształtowanie się prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Charakterystyka nowych szczepów bakteryjnych wraz z oceną ich właściwości immunomodulujących oraz metod ich podawania umożliwi opracowanie bardziej spersonalizowanych terapii oraz zmniejszy wystąpienie skutków ubocznych czy rozwoju bakteriemii u osób z obniżoną odpornością.

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono charakterystykę właściwości immunomodulujących wybranych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* przebadanych jako żywe i termicznie inaktywowane bakterie. W celu dokładnej charakterystyki badanych szczepów wykorzystano szeroki przekrój linii komórkowych oraz myszy model uczulenia na owoalbuminę (OVA). Badane szczepy charakteryzowały się zróżnicowanym potencjałem immunomodulacyjnym oraz stopniem pochłaniania i przekazywania między komórkami nabłonkowymi, a komórkami dendrytycznym. Ponadto termiczna inaktywacja wpłynęła na zmianę indukowanej przez te szczepy odpowiedzi cytokinowej. Na podstawie wyników stymulacji linii nabłonkowych układu oddechowego do dalszych badań wytypowano 4 szczepy *Bifidobacterium*: Bin 369, B1 7952, Bsd 373 oraz Ban 218. W następnym etapie mysie komórki śledziony uwrażliwione na OVA zostały poddane stymulacji wybranymi szczepami. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że szczepy te, zarówno jako żywe jak i termicznie inaktywowane bakterie, obniżają poziom cytokin szlaku Th2 indukowanych podaniem OVA. Szczep *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (B1 7952) jako jedyny z badanych szczepów nie indukował produkcji IFN- $\gamma$ , mediatora odpowiedzi limfocytów Th1. Brak aktywacji

szlaku Th1 oraz zahamowanie produkcji cytokin szlaku Th2 wskazuje, że potencjalne działanie przeciwalergiczne BI 7952 opiera się na aktywacji innych mechanizmów immunomodulujących. Właściwości te zostały sprawdzone w kolejnym etapie, gdzie podczas uwrażliwiania na owoalbuminę podawano myszom donosowo bakterie. Donosowe podanie żywych bakterii BI 7952 prowadzi do zmniejszenia alergicznego stanu zapalnego zarówno na poziomie lokalnym (w płucach) jak i systemowym. Oprócz obniżenia poziomu cytokin szlaku Th2 dochodzi do spadku poziomu przeciwciał IgE skierowanych przeciwko OVA. W płucach obserwowany jest spadek liczby komórek immunologicznych, a w szczególności eozynofili. Efekt uzyskany po podaniu myszom termicznie inaktywowanego szczepu BI 7952 jest znacznie słabszy. Obserwuje się jedynie obniżenie poziomu IL-4 oraz zmniejszenie ilości eozynofili przy równoczesnym wzroście liczby neutrofilii i makrofagów w płucach myszy uczulonych na OVA.

Wyniki te wskazują, że stan żywotności bakterii ma znaczący wpływ na ich właściwości immunomodulacyjne. Działanie wysoką temperaturą na bakterie może powodować zmiany strukturalne w różnego rodzaju związkach występujących na powierzchni komórek, takich jak białka, peptydoglikan, kwasy lipotejchajowe czy polisacharydy. Wskazuje to na istnienie cząsteczek efektorowych, które są odpowiedzialne za obserwowane właściwości. W kolejnych etapach pracy wyizolowano oraz scharakteryzowano właściwości immunomodulujące wybranych antygenów powierzchniowych BI 7952: peptydoglikanu, kwasów tejchajowych i polisacharydów. Związki te zostały wyizolowane, oczyszczone, a następnie przeprowadzono charakterystykę właściwości immunomodulacyjnych na wybranych liniach komórkowych oraz badania *in vitro* z wykorzystaniem naiwnych komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego oraz splenocytów. Wykazano, że cząsteczkami o największych właściwościach immunomodulujących były polisacharydy komórkowe oraz te wyizolowane ze śluzu. W przypadku kwasów lipotejchajowych (LTA) nie zaobserwowano żadnej aktywności, z kolei peptydoglikan (PGN) indukował dość słabą odpowiedź immunologiczną.

Wyniki przedstawione w tej pracy stanowią podstawę do dalszych badań nad opracowaniem preparatów przeciwalergicznych zawierających antygeny powierzchniowe. Szczep BI 7952 wykorzystany jest również przez doktorantkę w badaniach nad opracowaniem szybkiego testu przesiewowego do określenia właściwości przeciwalergicznych bakterii z wykorzystaniem ludzkich komórek nabłonka nosa w badaniach finansowanych z funduszy Narodowego Centrum Nauki w ramach Preludium 17 pt. „Donosowe podanie probiotyków – opracowanie modelu *in vitro* alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa oraz ocena potencjału zastosowania szczepów probiotycznych w jego zapobieganiu i leczeniu”.