

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk**



Rozprawa doktorska

mgr inż. Marcelina Joanna Pyclik

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

**Immunomodulatory properties of *B. longum* spp. *longum* CCM 7952
in the treatment of allergic diseases**

Promotor: dr hab. Sabina Górńska, prof. IITD PAN
Praca doktorska wykonana w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu
Zakład Mikrobiologii
Wrocław, 2023 r.

Badania przedstawione w niniejszej pracy były realizowane w ramach projektów:

Grant Narodowego Centrum Nauki SONATA BIS nr 2017/26/E/NZ7/01202 „Określenie struktury składników ściany komórkowej wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i ich rola w rozwoju chorób o podłożu alergicznym”

oraz

Grant wyjazdowy Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej MOBILITY nr PPN/BIL/2018/1/00005 „New strategy for alleviating allergic response: Effect of the surface bacterial antigens in the prevention and treatment of allergic inflammation in mouse model”



NARODOWE CENTRUM NAUKI



NARODOWA AGENCJA
WYMIANY AKADEMICKIEJ

Pragnę serdecznie podziękować:

***Dr hab. Sabinie Górskiej** za wprowadzenie w świat mikrobiomu człowieka, przekazaną wiedzę i cenne wskazówki merytoryczne, które umożliwiły mi ukończenie tej pracy doktorskiej. Cierpliwość, wyrozumiałość oraz wiarę w moje możliwości i nieustanną zachętę do poszerzania swoich horyzontów*

***Przyjaciółkom z Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu** za fantastyczną pracę zespołową i ogromną motywację w trudnych chwilach, a w szczególności **Dominice K.** za pomoc edytorską przy pracy doktorskiej*

***Zespołowi Laboratorium Gnotobiologii** za pomoc merytoryczną oraz wsparcie podczas realizacji badań na zwierzętach*

***Umesh S. Deshmukh i Harini Bagavant** za przyjęcie mnie pod opiekę w trakcie pobytu w Stanach Zjednoczonych, gdzie miałam możliwość korzystać z ich doświadczenia i wiedzy*

***Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Instytutu,** którzy przyczynili się do powstania tej pracy*

***Moim najbliższym** za cierpliwość i wsparcie w chwilach zwątpienia*

1 SPIS TREŚCI

2	SPIS SKRÓTÓW	11
3	STRESZCZENIE	13
4	SUMMARY	15
5	WSTĘP	17
5.1	Kliniczny objawy reakcji alergicznej	19
5.1.1	Mechanizm reakcji alergicznej	21
5.1.2	Metody leczenia alergii	23
5.2	Rozwój układu immunologicznego a mikrobiom.....	24
5.2.1	Stosowanie bakterii w leczeniu alergii	28
5.3	Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i>	29
5.4	Rola <i>Bifidobacterium</i> w rozwoju układu odpornościowego człowieka	31
5.5	Probiotyczne właściwości szczepów <i>Bifidobacterium</i>	32
5.6	Różnice między probiotykami a postbiotykami	34
5.7	Antygeny powierzchniowe <i>Bifidobacterium</i>	38
5.7.1	Peptydoglikan	38
5.7.2	Kwasy lipotejchowe	42
5.7.3	Glikolipidy i fosfolipidy	43
5.7.4	Polisacharydy.....	44
5.7.5	Białka ściany komórkowej	48
5.7.5.1	Serpiny.....	48
5.7.5.2	Struktury przypominające pilusy	49
5.7.5.3	Pilusy zależne od sortazy.....	49
5.7.5.4	Tad-pilusy.....	50
5.7.5.5	Bakteryjne systemy sekrecyjne typu IV (T4SS).....	50
5.7.5.6	Pozostałe białka powierzchniowe.....	50
6	CEL PRACY	52
7	MATERIAŁY I METODY	53
7.1	Szczepy bakteryjne i warunki hodowli.....	53
7.2	Inaktywacja termiczna bifidobakterii	54
7.3	Skaningowa mikroskopia elektronowa niskonapięciowa	54
7.4	Pomiary wielkości i ładunku szczepów <i>Bifidobacterium</i>	54
7.5	Warunki hodowli unieśmiertelnianych linii komórkowych	55
7.5.1	Badanie właściwości immunomodulujących bifidobakterii w warunkach <i>in vitro</i> wykorzystując linie unieśmiertelnione	57
7.5.2	Badanie cytotoksyczności bakterii za pomocą testu SRB	58

7.5.3	Badanie produkcji azotynów (NO ₂ ⁻) przez linie komórkowe w odpowiedzi na bifidobakterie	59
7.5.4	Badanie pochłaniania bakterii przez komórki nabłonka TC-1	59
7.5.5	Badanie przekazywania bakterii pomiędzy komórkami nabłonka TC-1, a komórkami dendrytycznymi JAWS II.....	60
7.6	Stymulacja komórek pierwotnych izolowanych z myszy Balb/c	60
7.7	Model <i>in vivo</i> mysiego modelu uwrażliwienia na owoalbuminę.....	62
7.7.1	Ocena poziomu cytokin produkowanych przez komórki śledziony stymulowane OVA.....	63
7.7.2	Analiza płynu oskrzelowo-pęcherzykowego	63
7.7.3	Ocena histopatologiczna płuc	63
7.7.4	Analiza poziomu przeciwciał w surowicy krwi obwodowej oraz BALF	64
7.8	Izolacja antygenów powierzchniowych	66
7.8.1	Peptydoglikan.....	66
7.8.1.1	Oczyszczanie peptydoglikanu	66
7.8.2	wasy lipotejchojowe.....	66
7.8.2.1	Oczyszczanie LTA	67
7.8.2.2	Kolorymetryczny pomiar reszt cukrowych metodą DuBois	67
7.8.3	Polisacharydy	67
7.8.3.1	Oczyszczenie polisacharydów	68
7.9	Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR).....	68
7.10	Analiza statystyczna.....	69
8	WYNIKI	70
8.1	Charakterystyka właściwości fizykochemicznych szczepów <i>Bifidobacterium</i>	70
8.2	Charakterystyka właściwości immunomodulujących termicznie inaktywowanych szczepów <i>Bifidobacterium</i>	73
8.2.1	Wpływ bifidobakterii na komórki układu odpornościowego.....	73
8.2.2	Pochłanianie bifidobakterii przez komórki nabłonka oraz przekazanie ich komórkom prezentującym antygen	79
8.2.3	Badanie roli receptorów TLR i NOD w rozpoznawaniu bifidobakterii	83
8.3	Porównanie właściwości immunomodulujących wybranych szczepów <i>Bifidobacterium</i> z wykorzystaniem komórek śledziony wyizolowanych z myszy uwrażliwionych na OVA	85
8.4	Donosowe podawanie nietraktowanego i termicznie inaktywowanego BI 7952 osłabia humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną w mysim modelu alergii wywołanej podaniem OVA	86
8.5	Antygeny powierzchniowe BI 7952 w zróżnicowanym sposób wpływają na odpowiedź immunologiczną.....	92
9	DYSKUSJA	97

10	WNIOSKI.....	109
11	LITERATURA.....	110
12	SPIS RYCIN.....	133
13	SPIS TABEL.....	140
14	DOROBEK NAUKOWY.....	141

2 SPIS SKRÓTÓW

Skrót	rozwińnięcie angielskie	rozwińnięcie polskie
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
BI	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>	-
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell	komórki dendrytyczne pochodzące ze szpiku kostnego
BMDM	bone marrow-derived macrophages	makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego
BSA	bovine serum albumin	surowicza albumina wołowa
CFU	colony forming unit	jednostka tworząca kolonie
CWP	cell wall polysaccharides	polisacharydy ściany komórkowej
DC	dendritic cells	komórki dendrytyczne
DLS	dynamic light scattering	dynamiczne rozpraszanie światła
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetylosulfotlenek
DSS	dextran sulfate sodium	sól sodowa siarczanu dekstranu
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	test immunoenzymatyczny
ELS	electrophoretic light scattering	elektroforetyczne rozpraszanie światła
EPS	exopolysaccharides	egzopolisacharydy
GF	germ free	wolne od drobnoustrojów, jałowe
GlcNAc	N-acetylglucosamine	N-acetyloglukozamina
Glu	glutamic acid	kwask glutaminowy
HEK 293	human embryonic kidney 293	ludzkie komórki zarodkowe nerki 293
HDM	house dust mist	roztocza kurzu domowego
IBD	inflammatory bowel disease	wrzodziejące zapalenie jelit
IBS	irritable bowel syndrome	zespół jelita drażliwego
IL	interleukin	interleukina
ILC2	group 2 innate lymphoid cells	komórki limfoidalne typu 2
i.n.	intranasal injection	podanie donosowe
i.p.	intraperitoneal injection	podanie dootrzewnowe
kDa	kilo dalton	kilo dalton
LPS	lipopolysaccharide	lipopolisacharyd
LTA	lipoteichoic acid	kwask lipotejchojowy
LV-SEM	low voltage scanning electron microscopy	skaningowy mikroskop elektronowy niskonapięciowy
M	molar concentration (mol/dm ³)	molarność (mol/dm ³)

mM	milimolar concertation (mmol/dm ³)	milimolarność (mmol/dm ³)
MES	2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid	kwasy 2-etanosulfonowy
MFI	Mean Fluorescence Intensity	średnia intensywność fluorescencji
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe	De Man, Rogosa, Sharpe
MRSC	De Man, Rogosa and Sharpe with 0,05% L-cysteine hydrochloride	De Man, Rogosa and Sharpe z 0,05% chlorowodorkiem L-cysteiny
MurNAc	N-acetylmuramic acid	kwasy N-acetylmuraminowy
NMR	nuclear magnetic resonance	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors	domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotydy
OVA	ovoalbumin	owoalbumina
OD	optical density	gęstość optyczna
PBS	phosphate buffered saline	buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PGN	peptidoglycan	peptydoglikan
PRRs	pattern recognition receptors	receptory rozpoznające wzorce
PS	polysaccharide	polisacharyd
rpm	revolutions per minute	obrotów na minutę
TLR	toll-like receptor	receptor toll-podobny
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3, 3', 5,5'-tetrametylobenzydyna
TSLP	thymic stromal lymphopoietin	limfopoetyna zębca grasicy
T4SS	type IV secretion systems	systemy sekrecyjne typu IV
SCFA	short-chain fatty acids,	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
SEM	scanning electron microscope	skaningowy mikroskop elektronowy
SDS	sodium dodecyl sulfate	dodecylosiarczan sodu
SPF	specific pathogen free	wolne od określonych patogenów
ssp.	subspecies	podgatunek
WAO	World Allergy Organization	Światowa Organizacja Alergii
WHO	World Health Organization	Światowej Organizacji Zdrowia

3 STRESZCZENIE

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, Bl 7952, Bad 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 (Bl 7952) jako jedyny z badanych szczepów nie indukował produkcji IFN- γ , mediatora odpowiedzi limfocytów Th1. Brak aktywacji szlaku Th1 oraz zahamowanie produkcji cytokin szlaku Th2 wskazuje, że potencjalne działanie przeciwalergiczne Bl 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 B1 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 B1 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 lipotejchojowe 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 B1 7952: peptydoglikanu, kwasów tejchojowych 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 lipotejchojowych (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 przeciwalergicznym zawierających antygeny powierzchniowe. Szczep B1 7952 wykorzystany jest również przez doktorantkę w badaniach nad opracowaniem szybkiego testu przesiewowego do określenia właściwości przeciwalergicznym bakterii z wykorzystaniem ludzkich komórek nabłonka nosa w badania 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”.

4 SUMMARY

Bacteria of the genus *Bifidobacterium* belong to a group of microorganisms referred to as pro-health bacteria for the human body. Their presence in the digestive tract of a newborn ensures proper immune system maturation. In the 21st century, the widespread use of antibiotics and a highly-processed diet, especially in developed countries, contributed to a decrease in the number and diversity of bacterial strains, e.g. of the genus *Bifidobacterium* in children (Olm et al., 2022). Disturbances in the qualitative and quantitative composition of the bacterial microflora lead to an increased likelihood of autoimmune or metabolic disorders. The most commonly observed diseases include allergies, chronic sinusitis, inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes (Milani et al., 2017b). **According to the World Allergy Organization (WAO), the number of people suffering from allergic diseases already reaches 40% of the world's population (Agache et al., 2019).** It is therefore important to conduct research on new methods of treating allergic diseases. One of the solutions is to increase the diversity of microflora that ensure proper immune responses. The characterization of new bacterial strains together with the assessment of their immunomodulatory properties and methods of their administration will enable the development of more personalized therapies and reduce the occurrence of side effects or the development of bacteremia in immunocompromised patients.

This doctoral thesis presents the characteristics of immunomodulatory properties of selected strains of the genus *Bifidobacterium* tested as live and thermally inactivated bacteria. In order to accurately characterize the tested strains, a wide range of cell lines and a mouse model of sensitization to ovalbumin (OVA) were used. The tested strains differed in the immunomodulatory potential and the degree of absorption and transfer between epithelial cells and dendritic cells. In addition, thermal inactivation changed the cytokine response induced by these strains. Based on the results of stimulation of the respiratory epithelial lines, 4 *Bifidobacterium* strains were selected for further research: Bin 369, B1 7952, Bad 373, and Ban 218. In the next step, mouse spleen cells sensitized to OVA were stimulated with selected strains. The conducted experiments showed that all tested strains, both live and thermally inactivated bacteria, reduce the level of Th2 pathway cytokines induced by OVA administration. However the strain *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (B1 7952) was the only one of the tested strains that did not induce the production of IFN- γ , a mediator of the Th1 lymphocyte response. Lack of activation of the Th1 pathway, and inhibition of the production of Th2 cytokines indicates that the potential anti-allergic effect of B1 7952 is based on the activation of other immunomodulatory mechanisms. These properties were checked in the next stage of research using a mouse model of sensitization to OVA. Intranasal administration of live B1 7952 bacteria leads to a reduction of allergic inflammation both at the local (lung) and systemic levels. Both, the level of Th2 cytokine and specific anti-OVA IgE antibody was decreased. In the lungs, a decrease in the number of immune

cells, in particular eosinophils, was observed. The effect obtained after administration of the thermally inactivated BI 7952 strain to mice is much weaker. Only a decrease in the level of IL-4 and the number of eosinophils was observed. The simultaneous increase in the number of neutrophils and macrophages in the lungs of OVA-sensitized mice was observed.

These results indicate that the viability status of bacteria has a significant impact on their immunomodulatory properties. The high temperature can cause structural changes in various types of compounds present on the bacterial surface such as proteins, peptidoglycan, lipoteichoic acids, or polysaccharides. This indicates the existence of effector molecules that are responsible for the observed properties. In the next stages of the work, BI 7952 surface antigens: peptidoglycan, teichoic acids, and polysaccharides were isolated, purified, and then the immunomodulatory properties were determined on selected cell lines and *in vitro* studies on naive cells isolated from the bone marrow and splenocytes. It was shown that the molecules with the greatest immunomodulatory properties were cellular polysaccharides and those isolated from mucus. In the case of LTA, no activity was observed, while peptidoglycan (PGN) induced a rather weak immune response.

The results presented in this paper are the basis for further research on the development of antiallergic preparations containing surface antigens. The BI 7952 strain is also used by a Ph.D. student in research on the development of a rapid screening test to determine the anti-allergic properties of bacteria using human nasal epithelial cells in research financed by the National Science Center under Preludium 17 entitled: "Intranasal administration of probiotics - development of an *in vitro* model of allergic rhinitis and assessment of the potential of using probiotic strains in its prevention and treatment".

5 WSTĘP

Ludzkie ciało zasiedlone jest przez ogromną ilość mikroorganizmów, do których zaliczamy bakterie, wirusy, grzyby i archeony. Występują one m.in. na naszej skórze, w układzie pokarmowym, oddechowym czy rozrodczym. Oddziaływanie mikroorganizmów na nasz organizm umożliwia kształtowanie się naszego układu odpornościowego oraz prawidłowy rozwój tkanek i organów (Berbers et al., 2017). Utrzymanie homeostazy w naszym organizmie jest uwarunkowane odpowiednią równowagą pomiędzy organizmami patogennymi a komensalnymi. Mikroorganizmy odgrywają znaczącą rolę w indukcji tolerancji immunologicznej, w procesie uczenia się przez nasz układ odpornościowy rozpoznawania szkodliwych cząsteczek (Turrone et al., 2022). Kluczowym momentem w życiu każdego człowieka są pierwsze miesiące życia. Badania wskazują, że tworząca się w tym okresie mikrobiota wpływa na możliwość wystąpienia chorób o podłożu autoimmunologicznym w dalszym życiu (Josefowicz et al., 2012; Milani et al., 2017a). Rozpoznanie specyficznych rodzajów bakterii przez naiwne limfocyty indukuje jedną z reakcji, w których limfocyty T mogą zwalczać bakterie (odpowiedź Th1, Th17) lub tolerować ich obecność w organizmie (odpowiedź T_{reg}) (Lathrop et al., 2011; Zhao and Elson, 2018). Do tej pory szczególnie zidentyfikowano kilka szczepów bakterii, których obecność skutkuje ukierunkowanym różnicowaniem się limfocytów T. Jednymi z nich są *Bacteroides fragilis*, które indukują u myszy germ-free (GF) znacznie większą liczbę limfocytów T_{reg} produkujących regulatorową IL-10 w porównaniu do myszy kontrolnych (Mazmanian et al., 2008). Kolonizacja szczepami *Clostridium* również skutkuje różnicowaniem się limfocytów w kierunku limfocytów T_{reg} produkujących IL-10 (Atarashi et al., 2011), natomiast występowanie w jelicie cienkim myszy szczepów *Candidatus*, określanych również jako segmentowe bakterie nitkowate, zwiększa ilość przeciwciał IgA oraz prowadzi do różnicowania się limfocytów w kierunku Th17 (Atarashi et al., 2015). Z kolei obecność *S. aureus* produkujących endotoksyny w układzie oddechowym skutkuje zwiększoną ilością przeciwciał IgE oraz limfocytów Th2 (Hollams et al., 2010). Szczepy z gatunku *Klebsiella* prowadzą do różnicowania się limfocytów w kierunku Th1 (Atarashi et al., 2017), a pojawienie się w organizmie pasożytów indukuje aktywację limfocytów szlaku Th2 (Ma et al., 2019).

Zachwianie równowagi pomiędzy mikroorganizmami w organizmie określane jest mianem dysbiozy mikrobioty. W zależności od miejsca jej wystąpienia określa się ją jako dysbiozę jelitową, pochwową czy układu oddechowego. Dysbioza charakteryzować się może nadmiernym rozrostem jednego bądź wielu gatunków mikroorganizmów, eradykacją niektórych gatunków lub pojawieniem się gatunków niepożądanych dla danego ekosystemu (Martinez et al., 2021). W konsekwencji zmiany te prowadzą do zachwiania komunikacji pomiędzy mikroorganizmami, a układem immunologicznym, co prowadzić może do patologicznych zmian w organizmie.

Do chorób immunologicznych związanych z dysbiozą należą nieswoiste zapalenie jelit (IBD), zespół jelita drażliwego (IBS), reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca typu 1 (Belizário and Faintuch, 2018), czy różnego rodzaju choroby o podłożu alergicznym (Bunyavanich and Berin, 2019).

Alarmująca jest zwłaszcza rosnąca liczba osób wykazujących oznaki alergii. Szacuje się, że w państwach rozwiniętych czy rozwijających się liczba ta może sięgać 40% populacji (Agache et al., 2019). Alergia jest patologiczną odpowiedzią układu odpornościowego na potencjalnie nieszkodliwe cząsteczki przyjmowane z pożywieniem, obecne w powietrzu lub po prostu w otoczeniu, z którymi nasz organizm może mieć kontakt. Reakcja alergiczna prowadzi do aktywacji takich komórek immunologicznych jak komórki tuczne, bazofile i limfocyty T. Istnieje kilka mechanizmów jakie reakcja alergiczna może uruchamiać w zależności od przeciwciał jakie są podczas niej wytwarzane. W przypadku reakcji zależnej od przeciwciał IgE obserwuje się wzrost cytokin szlaku limfocytów Th2 takich jak IL-4, IL-5 i IL-13.

Istnieje kilka teorii wskazujących jak dochodzi do rozwoju reakcji alergicznej. Czynniki genetyczne mogą predysponować do jej wystąpienia ale nie są one konieczne. Badania wskazują, że jedną z głównych przyczyn wystąpienia alergii jest dysbioza mikrobiologiczna. Może ona dotyczyć bakterii probiotycznych, które są wrażliwe na obecność antybiotyków. Bakteriami probiotycznymi zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) określa się żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej ilości wywołują efekt zdrowotny (FAO/WHO, 2001). Należą do nich szczepy m. in. *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus* (Patangia et al., 2022). Brak lub spadek liczby tych szczepów umożliwia wzrost innym bakteriom należącym do gromad *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Prawidłową mikroflorę można przywrócić poprzez przyjmowanie przebadanych szczepów probiotycznych w postaci leków, suplementów, czy w pożywieniu (np. nabiału zawierającego odpowiednie kultury bakteryjne). W leczeniu niektórych schorzeń, takich jak przewlekłe zapalenie jelit spowodowane *Clostridioides difficile* zalecany jest transfer mikroflory jelitowej tzw. przeszczep kału (Khoruts, 2018).

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* nazywane są również bakteriami kwasu mlekowego i należą do grupy fakultatywnych anaerobów. Stosowane są w preparatach mlecznych jak i suplementach diety (Górska et al., 2009). Z kolei szczepy *Bifidobacterium* są bezwzględnyimi anaerobami i znacznie trudniej hodować je w warunkach przemysłowych oraz przechowywać, tak by pacjent mógł przyjąć je jako żywe szczepy bakteryjne (Dylus et al., 2013). Jednak nowe badania wskazują, że niektóre inaktywowane szczepy probiotyczne lub ich antygeny również wykazują właściwości immunomodulacyjne identyczne lub zbliżone działaniem jakie obserwuje się po podaniu żywych bakterii (de Almada et al., 2016a). Inaktywowane bakterie lub elementy ściany komórkowej bakterii wraz z końcowymi produktami ich metabolizmu takimi jak krótkołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe (SCFA) nazywane są postbiotykami. Proces inaktywacji bakterii zachodzi najczęściej poprzez obróbkę w wysokiej temperaturze, jednak można do tego celu wykorzystać

również promienie ultrafioletowe (UV), sonikację czy działanie związkami chemicznymi. Stosowanie postbiotyków eliminuje problemy technologiczne związane z przygotowaniem żywych bakterii, jak również umożliwia podanie dokładnie określonej dawki preparatu (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Badania przedstawione w mniejszej pracy doktorskiej skupiają się na porównaniu właściwości immunomodulujących wybranych szczepów *Bifidobacterium* oraz określeniu czy ich inaktywacja wysoką temperaturą prowadzi do zmian ich właściwości biologicznych, w tym działania przeciwalergicznego. Wykazano, że szczep *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 hamuje odpowiedź szlaku Th2 w mysim modelu uczulenia na OVA. Potraktowanie bakterii wysoką temperaturą spowodowało zanik niektórych właściwości. Wyizolowano i oczyszczono antygeny powierzchniowe tj. peptydoglikan, kwasy lipoteichojoyowe i polisacharydy i określono ich właściwości immunomodulujące z wykorzystaniem komórek linii nabłonkowych, dendrytycznych i splenocytów.

5.1 KLINICZNY OBJAWY REAKCJI ALERGICZNEJ

Alergia stanowi nieprawidłową, patologiczną odpowiedź układu odpornościowego, a etiologia choroby nie jest do końca poznana. W medycynie pojęcie alergii jest bardzo szerokie i powiązane z terminami takimi jak nietolerancja, atopia, czy astma. Nietolerancje pokarmowe związane są przede wszystkim z występowaniem specyficznych przeciwciał IgG lub brakiem kluczowego enzymu, jak w przypadku nietolerancji laktozy (Lomer, 2015). Zaburzeniem odpowiedzi immunologicznej wynikającym z genetycznych predyspozycji jest z kolei atopia. Po zetknięciu się z alergenem dochodzi do nadreaktywności komórek tucznych, a co za tym idzie, wzrostu poziomu cytokin prozapalnych i przeciwciał IgE (Justiz Vaillant et al., 2023). Astma z kolei jest chorobą zapalenia dróg oddechowych, w której dochodzi do skurczu oskrzeli, pojawienia się świszczącego oddechu, duszności i kaszlu. Jeśli reakcja ta zostaje wywołana alergenem określa się to jako astma alergiczna. Aktywowane zostają wtedy limfocyty Th2 oraz uwolnione przeciwciała IgE (Boonpiyathad et al., 2019). Definicje wszystkich wymienionych wyżej pojęć są do siebie zbliżone i dlatego też często zdarza się, że ciężko określić, który rodzaj choroby występuje u pacjenta. Ponadto ze względu na mechanizm jaki jest uruchamiany w reakcji alergicznej alergię dzielimy na:

- a) Alergię niezależną od przeciwciał IgE, której diagnostyka jest utrudniona ze względu na opóźnioną reakcję (nawet po kilku dniach) immunologiczną dającą niespecyficzne objawy. Ponadto obserwuje się występowanie przeciwciał IgG i IgM (typ II tzw. cytotoksyczny), tworzenie kompleksów immunologicznych między alergenem, a przeciwciałami IgG (typ III) lub aktywację swoistych limfocytów T (typu IV) (Yu et al., 2016). Wykazano, że w przypadku

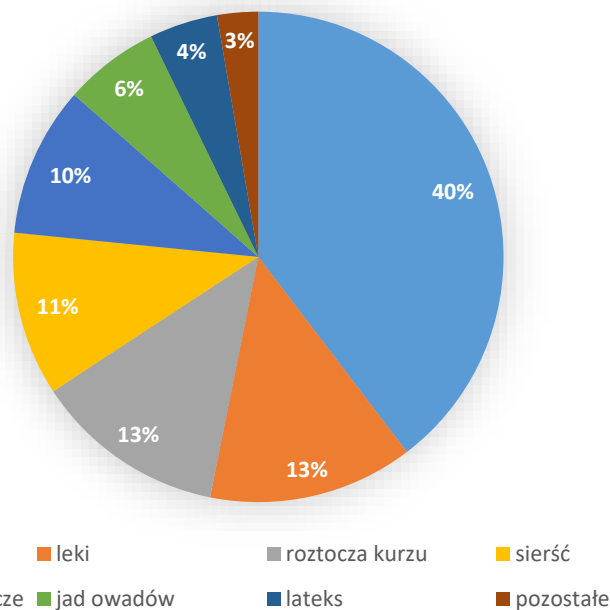
rozwoju alergii niezależnej od IgE często dochodzi do całkowitego ustąpienia objawów do 3 roku życia (Savage et al., 2016).

- b) Alergię zależną od przeciwciał IgE, w której to udział biorą przeciwciała IgE, a okres od kontaktu z alergenem do wystąpienia reakcji immunologicznej jest prawie natychmiastowy (Yu et al., 2016). Z badań nad alergią pokarmową wynika, że obecność wysokiego poziomu przeciwciał IgE prowadzi do rozwoju przewlekłej alergii. Ponadto powiązano ten rodzaj alergii z występowaniem u dorosłych alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa (Savage et al., 2016).

Wyróżnia się cztery podstawowe rodzaje reakcji alergicznej w zależności od rodzaju alergenu oraz miejsca kontaktu (**Rycina 1**):

1. Alergia wziewna, która zapoczątkowywana jest przez alergen znajdujący się w powietrzu. Jej pierwszymi objawami są katar, świąd, napady kichania lub kaszlu bez wystąpienia gorączki. Alergeny tej grupy dzieli się na: alergeny całoroczne takie jak roztocza kurzu domowego (HDM), i sezonowe takie jak pyłki roślin. Ponadto u pacjentów uczulonych na pyłki drzew często dochodzi do wystąpienia reakcji krzyżowej skutkującej wystąpieniem różnego rodzaju alergii pokarmowych. Dochodzi wtedy do reakcji na związki posiadające homologiczną budowę jak alergeny wywołujące alergię wziewną. W przypadku uczulenia na pyłek brzozy mogą to być jabłka, gruszki, pomidory czy orzechy laskowe i włoskie (pod. red. Pawliczak, 2013).
2. Alergia pokarmowa, która objawia się występowaniem wymiotów lub biegunki po spożyciu alergenu. Pojawia się również ból brzucha, opuchlizna i zmiany skórne. W niektórych przypadkach dochodzi również do niespecyficzných reakcji organizmu takich jak swędzenie, kichanie czy problemy z oddychaniem. Do najbardziej powszechnych alergenów należą tutaj mleko krowie, kurze jajka, ryby, gluten czy orzechy (Wrzyszc and Mazur, 1997). Częściej jest diagnozowana u dzieci niż u dorosłych.
3. Alergia kontaktowa, która występuje gdy dochodzi do reakcji alergenu na powierzchni komórek nabłonka skóry. Skutkuje wystąpieniem pieczenia, pojawieniem się silnego zaczerwienienia, pęknięć lub egzemy w miejscu kontaktu. Do środków uczulających należą lateks, kosmetyki, metale i barwniki (Mowad et al., 2016).
4. Alergia na jad owadów, objawia się miejscowym występowaniem obrzęku lub reakcją ogólnoustrojową prowadzącą do wstrząsu anafilaktycznego (Burzyńska and Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

Zestawienie alergenów wywołujących reakcję alergiczną u pacjentów



Rycina 1 Zestawienie związków wywołujących odpowiedź immunologiczną organizmu u pacjentów chorych na alergię. Dane uzyskane na podstawie ankiety przeprowadzonej wśród obywateli USA, zebranej w 2021 przez J. Elfein (<https://www.statista.com/statistics/1243167/common-allergies-us/>)

5.1.1 Mechanizm reakcji alergiczej

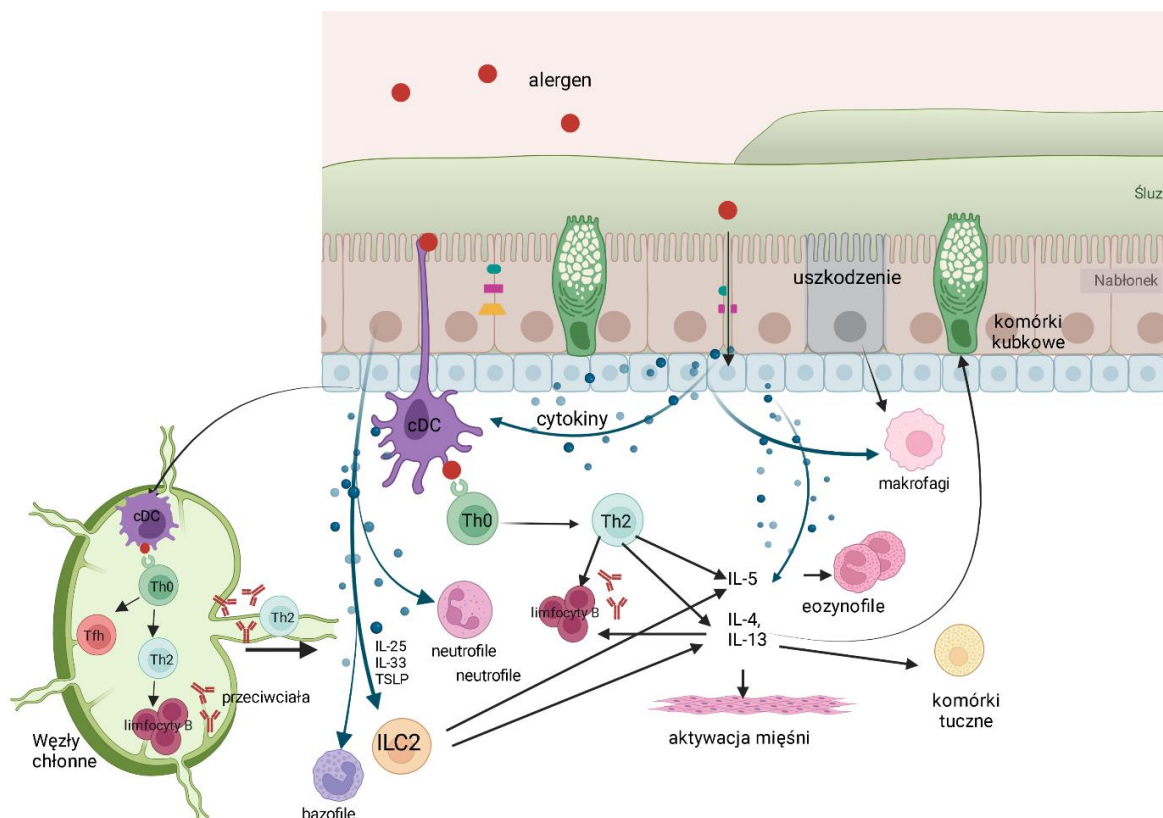
U podstaw immunopatogenezy reakcji alergiczej leżą zaburzenia homeostazy między limfocytami Th2 i Th1. W normalnych, fizjologicznych warunkach, szlak Th2 ten jest uruchamiany w odpowiedzi na obecność pasożytów i ma na celu zablokowanie ich wniknięcia przez komórki nabłonka do organizmu. W procesie tym udział biorą limfocyty pomocnicze typu 2, eozynofile, komórki tuczne i bazofile. Przeciwciała IgE wiążą się z antygenami na powierzchni pasożytów, naprowadzając eozynofile, które to po związaniu do fragmentów przeciwciał IgE indukują reakcję cytotoksyczną (Allen and Sutherland, 2014).

W przypadku alergii, kontakt alergenu z organizmem zapoczątkowuje szereg jednoczesnych i następujących po sobie reakcji (**Rycina 2**). Alergen może dostać się do organizmu poprzez przeniknięcie przez uszkodzoną wcześniej barierę lub poprzez czynne uszkodzenie nabłonka. Przykładem ostatniego może być alergen HDM, który dzięki swoim właściwościom proteolitycznym uszkadza błonę w miejscu kontaktu (Soh et al., 2023). Następnie komórki nabłonkowe rozpoczynają uwalnianie alarmin tj. IL-33, IL-25 (opisywanej również jako IL-17E), limfopoetyny zrębu grasicy (TSLP) oraz innych cytokin pro-zapalnych. Cząsteczki te są stymulatorami stanu zapalnego, jednak pełnią różną rolę. Przykładowo, IL-25 produkowana jest

w bardzo wysokim stężeniu u myszy uwrażliwionych na alergen, zwiększając napływ eozynofili i aktywację komórek dendrytycznych (DC). U ludzi IL-25 zwiększa również ilość populacji plazmacytoidalnych DC. Z kolei IL-33 indukuje zwiększenie wytwarzania cytokin i chemokin szlaku Th2 przez komórki immunologiczne. Ponadto na zaawansowanym etapie reakcji alergicznej cytokina ta aktywuje bazofile i komórki tuczne, które są źródłem IL-4 i IL-13 (Gordon et al., 2016; Motomura et al., 2014). TSLP uważa się za główny regulator odpowiedzi immunologicznej Th2, a u ludzi jest również związany z napływem neutrofilii i szlakiem Th17 (Ji and Li, 2023). Alarminy IL-25, IL-33, TSLP aktywują dojrzewanie i namnażanie komórek limfoidalnych typu 2 (ILC2) rezydujących w okolicznych tkankach (Toki et al., 2020). ILC2 są nowo scharakteryzowaną grupą komórek, które fenotypowo i funkcjonalnie odpowiadają limfocytom Th2, jednak nie produkują cytokin w odpowiedzi na antygen oraz nie ulegają pozytywnej selekcji. Cytokiny i mediatory lipidowe produkowane przez komórki nabłonka aktywują ILC2, co prowadzi do produkcji przez te komórki dużych ilości IL-4, IL-5 oraz IL-13 (Klose and Artis, 2016; Rawlins et al., 2009). Powoduje to aktywację i podział eozynofili, a także ich napływ do miejsca zapalenia razem z alternatywnie aktywowanymi makrofagami. Uwolnienie IL-13 powoduje dojrzewanie i migrację DC do węzłów chłonnych (Eberl et al., 2015). Cytokina ta zwiększa również produkcję śluzu w komórkach kubkowych znajdujących się w nabłonkach układu oddechowego i pokarmowego. Zwiększona produkcja śluzu prowadzi do rozerwania białek ścisłych połączeń między komórkami tworzącymi nabłonek oraz indukuje ścieżkę alternatywnego aktywowania makrofagów (Liang et al., 2012; Sugita et al., 2018). Działanie synergistyczne IL-4 oraz IL-13 wpływa na kurczliwość mięśni gładkich dróg oddechowych (Ji and Li, 2023). Z kolei IL-5 zwiększa rekrutację eozynofili do miejsca uszkodzenia nabłonka, a IL-4 stymuluje wytworzenie przeciwciał IgE i IgG1 przez limfocyty B (Cohn et al., 1997).

Dojrzałe DC w węzłach chłonnych prezentują antygeny limfocytom pomocniczym folikularnym T (T_{hf}), które następnie biorą udział w różnicowaniu naiwnych limfocytów T do limfocytów Th2. Z kolei zróżnicowane limfocyty Th2 produkują IL-4, IL-5 i IL-13, które aktywują kolejne naiwne limfocyty (Guo et al., 2015b). Ponadto DC i limfocyty T_{hf} aktywują limfocyty B obecne w miejscu zapalenia, jak i w węzłach chłonnych, stymulując tym samym wytworzenie przeciwciał IgE, które z kolei aktywują bazofile.

Komórki tuczne, eozynofile i bazofile produkują granule oraz reaktywne formy tlenu (Ji and Li, 2023). W granulach znajdują się histamina oraz mediatory lipidowe, które zapoczątkowują natychmiastową reakcję immunologiczną. Histamina pogłębia reakcję poprzez blokowanie różnicowania limfocytów Th1, przy jednoczesnej stymulacji limfocytów Th2 (Pucillo et al., 2018). W zależności od miejsca reakcji dochodzi do wycieku naczyniowego, skurczu oskrzeli czy świądu (Espinosa-Riquer et al., 2020).



Rycina 2 Graficzne przedstawienie reakcji alergicznej zachodzącej w miejscu kontaktu z alergenem oraz w węzłach chłonnych (Biorender.com)

5.1.2 Metody leczenia alergii

Obecnie immunoterapia jest jedynym sposobem leczenia alergii. Wszystkie pozostałe metody hamowania reakcji alergicznej niwelują tylko jej objawy. Chorzy w pierwszej kolejności starają się wyeliminować przyczynę reakcji alergicznej. Przy brak możliwości unikania kontaktu z alergenem są oni zmuszeni stosować leki przeciwalergiczne lub zdecydować się na rozpoczęcie immunoterapii. Przyjmowanie leków przeciwalergicznych hamuje określony etap reakcji immunologicznej zachodzącej w wyniku kontaktu z alergenem. Najczęściej stosowane są leki przeciwhistaminowe blokujące receptory H1, znajdujące się między innymi na powierzchni komórek immunologicznych i endotelialnych, uniemożliwiając produkcję tego mediatora stanu zapalnego (Pucillo et al., 2018). Pacjenci przyjmować mogą również kortykosteroidy (określane powszechnie jako sterydy), które są syntetycznymi pochodnymi hormonów kory nadnerczy. Charakteryzują się szerokim spektrum działania: hamują ekspresję genów białek zapalnych, zapobiegają uwalnianiu się mediatorów stanu zapalnego oraz redukują ilość komórek immunologicznych w miejscu zapalenia (Barnes, 2001). Od niedawna wykorzystuje się leki zawierające monoklonalne przeciwciała, które blokują receptory takich cytokin czy przeciwciał jak IL-33, IL-5, IL-4 czy IgE uniemożliwiając aktywację komórek immunologicznych (Chen et al., 2021). W przypadku gwałtownej odpowiedzi immunologicznej po kontakcie z alergenem, gdy u pacjenta pojawia się szok anafilaktyczny wykorzystuje się zastrzyki z adrenaliną. Dochodzi wtedy

do prawie natychmiastowego zahamowania reakcji, rozkurczu oskrzeli, zaniku pokrzywki czy obrzęku (Yu et al., 2016).

Obecnie jedyną metodą leczenia alergii jest swoista immunoterapia. Jej zastosowanie możliwe jest dzięki dokładnemu poznaniu mechanizmu działania limfocytów T w odpowiedzi immunologicznej. Nadal nie wiadomo dokładnie dlaczego u niektórych pacjentów daje ona trwałe efekty odczulające, a u niektórych tylko okresowe. Jednym z wyjaśnień może być zróżnicowany poziom limfocytów T_{reg} scharakteryzowanych jako $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{neg/low}$. W przypadku pacjentów z niskim poziomem limfocytów T_{reg} pod wpływem terapii dochodzi do wzrostu ich poziomu i dzięki temu lepszej odpowiedzi na terapię niż w przypadku pacjentów, u których przed terapią zaobserwowano wyższy poziom limfocytów T_{reg} (Gajdanowicz et al., 2020). Sam proces tzw. odczulania trwa wiele miesięcy, a nawet lat i polega na podawaniu pacjentowi w odstępach czasowych alergenów zaczynając od niewielkiej dawki i zwiększając ją do poziomu, który nie wzbudza niepożądanego odpowiedzi immunologicznej, a pozwala na indukcję tolerancji. Podczas długotrwałej stymulacji komórek immunologicznych niskimi dawkami dochodzi do spadku poziomu limfocytów Th2 i wzrostu liczby limfocytów Th1. Dzieje się to w wyniku aktywacji szlaku prowadzącego do produkcji limfocytów T_{reg} i immunosupresorowych cytokin IL-10 i TGF- β , których ilość w trakcie trwania terapii rośnie. Głównym mechanizmem na jakim opiera się terapia jest wywołanie odpowiedzi opóźnionej i związanej z nią wzrostem poziomu przeciwciał IgG4, determinowanym przez obecność IL-10. Przeciwciała te z kolei wpływają na zmniejszenie poziomu przeciwciał IgE specyficznych względem alergenów oraz zahamowują aktywację komórek tucznych i bazofoili (Alvaro-Lozano et al., 2020; Yu et al., 2016).

5.2 ROZWÓJ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO A MIKROBIOM

W przypadku reakcji alergicznej układ odpornościowy reaguje na substancję obcą tzw. alergen - cząsteczkę, która nie stanowi zagrożenia dla organizmu człowieka. Po kontakcie z alergenem organizm uruchamia szereg reakcji immunologicznych prowadzących do wywołania stanu zapalnego. Brak dokładnie zdefiniowanych przyczyn takiej reakcji, wskazuje, że wystąpienie chorób o podłożu alergicznym jest sumą wielu składowych, dlatego też opisanie dokładnych mechanizmów aktywujących cały szlak odpowiedzi immunologicznej jest wciąż przedmiotem badań i nie wszystkie jego aspekty są szczegółowo poznane (Hong et al., 2020).

Najpowszechniejszymi hipotezami wyjaśniającymi występowanie zjawiska alergii są hipoteza tzw. „starych przyjaciół” i hipoteza „bioróżnorodności” wskazujące na zależność między mikrobiomem, a zdrowiem człowieka (Haahtela et al., 2013; Strachan, 1989). Postulują one, że zmiana stylu życia doprowadziła do ograniczenia ilości mikroorganizmów w organizmie człowieka. Osoby najczęściej diagnozowane jako alergicy zamieszkują kraje wysoko rozwinięte i rozwijające się. Styl życia prowadzony w tych krajach często określany jest jako wysoko

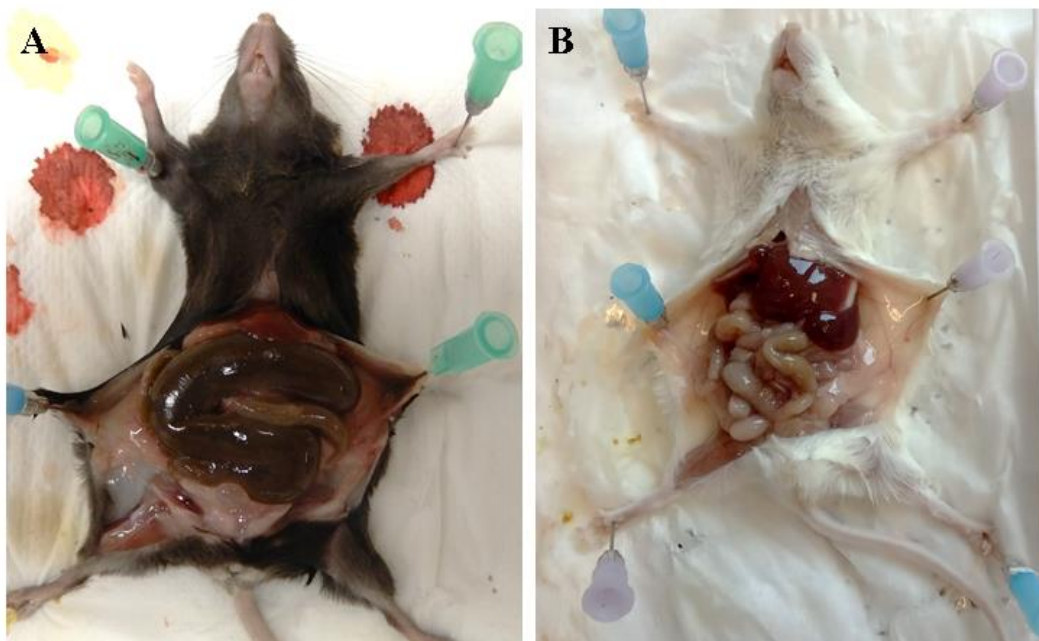
higieniczny, stresujący i opierający się na wysoko przetworzonej żywności (Berbers et al., 2017). Mikroorganizmy, które ewoluowały przez tysiące lat jako integralna część organizmu ludzkiego, nie były w stanie przystosować się do tak szybkich zmian jakie zaszły w naszym sposobie życia w przeciągu ostatnich lat (Turrone et al., 2022). Brak odpowiedniej flory uniemożliwia prawidłowe dojrzewanie centralnego układu nerwowego oraz odpornościowego (Rook et al., 2017), co w konsekwencji skutkuje nieprawidłowym funkcjonowaniem tkanek i organów, i prowadzi do rozwoju nieprawidłowych reakcji organizmu na różnego rodzaju patogeny, czy związki chemiczne.

Jeszcze do niedawna uważano, że worek owodniowy jest sterylnym środowiskiem, a do pierwszego kontaktu dziecka z bakteriami dochodzi dopiero podczas porodu, w drogach rodnych matki. W przypadku cesarskiego cięcia tymi mikroorganizmami są bakterie znajdujące się na skórze i sprzęcie medycznym (Perez-Muñoz et al., 2017). Wyniki meta-analizy badań skupiających się nad identyfikacją bakterii w worku owodniowym podważają jednak te założenia i wskazują, że łożysko mogą kolonizować szczepy *Lactobacillus*, *Ureaplasma*, *Fusobacterium*, *Staphylococcus*, *Prevotella* i *Streptococcus*. Oprócz nich zidentyfikowano bakterie takie jak *Propionibacterium*, *Pseudomonas* i *Escherichia*, jednakże, uważa się, że mogą one być zanieczyszczeniem, gdyż ich obecność zidentyfikowano również w próbkach kontrolnych zawierających wodę o wysokim stopniu czystości (Zakis et al., 2022). Pomimo braku pewności co do momentu, w którym dochodzi do pierwszego kontaktu organizmu z bakteriami, naukowcy są zgodni, że zapoczątkowuje on szereg reakcji prowadzących do kształtowania układu odpornościowego gospodarza a także do prawidłowego dojrzewania pozostałych układów, narządów czy tkanek (Milani et al., 2017a).

Nowe badania wskazują, że to nie sposób narodzin zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia alergii, a mniejsza ilość dzieci w rodzinie, brak kontaktu ze zwierzętami, nadmierna higiena, przyjmowanie antybiotyków i zanieczyszczenie środowiska naturalnego (Currell et al., 2022). Badania wskazują, że najważniejszym okresem dla kształtowania się m.in. układu odpornościowego jest okres od narodzin do 3 miesiąca życia. Interakcje zachodzące w tym okresie aktywują receptory rozpoznające wzorce (PRR), a następnie uwolnienie cytokin i peptydów antimikrobiologicznych. One z kolei modulują odpowiedź organizmu oraz mechanizmy aktywacji w zależności od substancji z jaką organizm się zetknie w dalszym życiu. Umożliwia to układowi odpornościowemu podział mikroorganizmów na komensalne, patogeny, czy bakterie probiotyczne (Berbers et al., 2017). Kształtowanie układu odpornościowego oraz mikrobiomu jelitowego kończy się mniej więcej w okresie przejścia dziecka z pokarmu płynnego na stały, czyli około 2 - 3 roku (Yatsunenکو et al., 2012). W badaniach prowadzonych na myszach wykazano, że bakterie kolonizujące młody organizm są w stanie zróżnicować populacje limfocytów B. Limfocyty te następnie produkują naturalne przeciwciała (należące do klasy IgA, IgG i IgM) skierowane przeciwko znacznej liczbie glikanów bakteryjnych (Bello-Gil et al., 2019). Potwierdzają to badania z wykorzystaniem antybiotyków podawanym młodym myszom, gdzie oprócz dysbiozy jelitowej obserwuje się spadek liczby IgA⁺ limfocytów B oraz samego poziomu przeciwciał IgA (Borbet et

al., 2023). Przeciwciała te w późniejszym etapie życia myszy rozpoznają bakterie zamieszkujące układ pokarmowy, jednak mechanizm ich działania nadal nie jest dokładnie poznany. Interesującym spostrzeżeniem jest to, że bakterie należące do tej samej rodziny taksonomicznej i zasiedlające ten sam organizm indukują powstanie jednego specyficznego przeciwciała IgA, IgG lub IgM, a nie wielu (Bello-Gil et al., 2019).

Najlepszym modelem badań nad wpływem mikrobioty na organizm gospodarza są myszy germ-free (GF). Myszy te nie posiadają żadnej mikroflory i aby je uzyskać wykorzystuje się intensywną antybiotykoterapię lub metodę cesarskiego cięcia, by młode urodziły się w sterylnych warunkach (Al-Asmakh and Zadjali, 2015). Dzięki badaniom porównawczym między myszami konwencjonalnymi, a myszami GF łatwo obserwować wpływ mikroorganizmów na kształtowanie się m.in. układu nerwowego, pokarmowego czy oddechowego (Kennedy et al., 2018). Wykorzystanie myszy GF umożliwia ponadto badania nad pojedynczymi szczepami mikroorganizmów lub mikrobiomem konkretnie zdefiniowanej grupy osób, np. badanie wpływu mikrobiomu osób otyłych. Już w latach 70 obserwacje myszy GF wykazały, że to dzięki cząsteczkom bakteryjnym dochodzi do różnicowania i dojrzewania kępek Peyera i enterocytów w śluzówce jelita (Pollard and Sharon, 1970). Struktury limfoidalne u myszy GF nie dojrzewają, co skutkuje większą wrażliwością tych myszy na patogenne mikroorganizmy (Zhang et al., 2016b). Dochodzi również do zmian struktur poszczególnych części jelit, gdyż w wyniku braku mikroorganizmów nie dochodzi do prawidłowego rozwoju śluzówki i kosmków jelitowych (**Rycina 3**). Utrudnia to przyswajanie niezbędnych dla organizmu substancji i minerałów (Gabay et al., 2020).



Rycina 3 Układ pokarmowy myszy *germ-free* i konwencjonalnej. (A) Mysz hodowana w warunkach *germ-free* na znacznie mniejszą wątrobę oraz ilość tłuszczu, ponadto znacznie powiększone jelito ślepe (B) mysz hodowana w warunkach kontrolnych na normalną wielkość wątroby i poziom tłuszczu.

Oprócz widocznych zmian fizjologicznych dochodzi również do zmian na poziomie populacji komórek (Kennedy et al., 2018). Myszy GF mają wyraźnie zredukowaną liczbę oraz dojrzałość komórek mieloidalnych, ponadto monocyty mają upośledzone możliwości migracji w organizmie (Emal et al., 2017; Khosravi et al., 2014). Nie zaobserwowano zmian ilościowych populacji komórek dendrytycznych, jednak ich funkcje i dojrzewanie są znacznie zmienione w porównaniu do myszy konwencjonalnych (Ganal et al., 2012). Brak aktywacji szlaku receptora TLR2 przez mikroorganizmy powoduje z kolei zmniejszenie populacji limfocytów T_{H1} u myszy GF. Skutkuje to obniżeniem poziomu przeciwciał IgA o wysokim powinowactwie do mikroflory śluzówkowej (Kubinak et al., 2015). Ponadto nie obserwuje się obecności żadnych naturalnych przeciwciał, które występują w myszach konwencjonalnych (Hapfelmeier et al., 2010).

Brak mikroflory powoduje, że wywołanie reakcji alergicznej u myszy GF indukuje znacznie silniejszą odpowiedź immunologiczną niż u myszy konwencjonalnych czy myszy wolnych od specyficznych patogenów (SPF). Zwłaszcza poziom przeciwciał IgE w surowicy krwi jest znacznie wyższy u myszy GF. Ponadto obserwuje się również znaczące różnice w poziomach pozostałych przeciwciał (IgA, IgG1 i IgG2) pomiędzy myszami GF, a myszami konwencjonalnymi/SPF. Wyniki wskazują, że podczas reakcji alergicznej naiwne limfocyty B znajdujące się w śluzówce jelitowej myszy GF mogą być odpowiedzialne za produkcję przeciwciał IgE (Cahenzli et al., 2013). Wysoki poziom IgE w jelicie cienkim u myszy GF w porównaniu do myszy SPF został zaobserwowany również przez Jimenez-Saiz i współp. (Jiménez-Saiz et al., 2020). Ich wyniki wskazują, że taka sytuacja obserwowana jest zarówno u myszy GF szczepów Balb/c i C57Bl/6. Badania Stefka i współp. również wskazują, że myszy GF uwrażliwione na orzechy arachidowe wykazują wysoki poziom cytokin i przeciwciał charakterystycznych dla szlaku Th2 w porównaniu do myszy konwencjonalnych/SPF. Ponadto zidentyfikowali mikroorganizmy należące do grupy *Clostridia*, które mogą mieć ochronny wpływ i osłabiać reakcję alergiczną (Stefka et al., 2014). W innych badaniach wykazano, że brak szczepów z rodzaju *Staphylococcus* wpływa na większą wrażliwość komórek układu odpornościowego myszy GF. U myszy tych obserwowany jest również znacznie wyższy poziom właściwości proteolitycznych w komórkach tucznych błony śluzowej w porównaniu do myszy konwencjonalnych (Rodriguez et al., 2011). Brak mikroflory prowadzi do spadku liczby jak również braku dojrzewania komórek tucznych (Schwarzer et al., 2019). Badania na modelach mysich wskazują, że obecność zróżnicowanej mikrobioty, a nie konkretnych szczepów reguluje prawidłowe działanie szlaku limfocytów Th2. Najprawdopodobniej reakcja polega na obecności dużej ilości antygenów powierzchniowych jak i związków produkowanych przez bakterie, które wpływają na indukcję limfocytów T_{reg} (Foxp3⁺), które z kolei regulują limfocyty Th2 (Atarashi et al., 2011; Zhao and Elson, 2018).

Obecne w pożywieniu związki i mikroorganizmy trafiają do jelit, gdzie stykają się z komórkami nabłonkowymi, których podstawową rolą jest zapewnienie bariery między środowiskiem zewnętrznym, a wewnętrznym. Komórki te uniemożliwiają przedostanie się

patogenów, toksyn i antygenów do wnętrza organizmu. Ponadto w warstwie tej znajdują się komórki produkujące śluz (Johansson et al., 2013). Glikoproteiny w nim obecne umożliwiają wychwytywanie i zamykanie bakterii, wirusów czy grzybów umożliwiając ich usunięcie jeszcze za nim dotrą do powierzchni nabłonka. Zmniejsza to ilość antygenów rozpoznawanych przez komórki układu odpornościowego, a tym samym ogranicza ich immunogenność. W warstwie śluzówkowej dochodzi również do produkcji przeciwciał IgA, działających jako jedna z pierwszych linii ochrony przeciwbakteryjnej wiążąc się z obcymi antygenami obecnymi w świetle przewodu jelita. Obecność tych przeciwciał skierowanych przeciw mikrobiocie obserwuje się u zdrowych myszy i ludzi. Ponadto określa się je jako krzyżowo specyficzne, ponieważ wiążą się do bakterii posiadających zbliżone struktury antygenowe na powierzchni komórki, co wskazuje to, że mogą one regulować skład mikroflory (Pabst, 2012).

W badaniach na myszach, u których zaraz po narodzinach rozpoczęto antybiotykoterapię zaobserwowano zmiany w składzie mikroflory jelitowej, które utrzymywały się nawet do 2 miesięcy po zakończeniu terapii. Myszy te poddane ekspozycji na roztocza kurzu domowego (HDM) wykazywały objawy reakcji alergicznej. Zaskakujące było, że starsze myszy GF, którym podano kał myszy z grup po antybiotykoterapii nie wykształciły żadnej alergii po kontakcie z HDM, jednak u ich potomstwa obserwowano wystąpienie reakcji alergicznej (Borbet et al., 2022).

5.2.1 Stosowanie bakterii w leczeniu alergii

Kolonizacja organizmu człowieka mikroorganizmami umożliwia kształtowanie odpowiednich mechanizmów immunologicznych, a jej zachwianie może prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych (Berbers et al., 2017). Wiadomo, że znacznie większa ilość bakterii *Enterobacteriaceae* w porównaniu do *Bacteroidaceae* w okresie niemowlęcym została powiązana z rozwojem alergii pokarmowej w pierwszym roku życia (Azad et al., 2015). Z kolei wzrost ilości szczepów z rodziny *Streptococcaceae* i *Lachnospiraceae* przy równoczesnym spadku *Leuconostocaceae* jest powiązany z alergią na białka jajka kurzego (Fazlollahi et al., 2018). Z drugiej strony, wskazano, że obecność bakterii z gatunków *Clostridium* i segmentowych bakterii nitkowatych (ang. segmented filamentous bacteria, SFB) indukuje szlak limfocytów Th17 i produkcję przeciwciał IgA łagodząc alergiczny stan zapalny (Bonnegarde-bernard et al., 2014). Szczepy *B. longum* IM55 i *Lactobacillus plantarum* IM76, wyizolowane z kału zdrowych ludzi, redukują poziom przeciwciał IgE oraz poziom cytokin IL-4 i IL-5 w modelu alergicznego nieżyty nosa wywołanego OVA u myszy (Kim et al., 2019). Podobnie podanie *B. breve* M-16V i fruktooligosacharydów hamuje alergiczny stan zapalny w płucach myszy wywołanych OVA (Sagar et al., 2014).

Większość bakterii dociera do organizmu wraz z pokarmem, dlatego też preparaty probiotyczne początkowo również były przygotowywane tak by można było je przyjąć w formie

doustnej. Badania naukowe z kilku ostatnich lat opisują nowy trend, w którym to probiotyki podawane są donosowo. Porównanie efektywności podawania szczepu *L. paracasei* NCC2461 w formie doustnej i donosowej myszom uwrażliwionym na OVA wykazało, że podanie donosowe znacznie bardziej zmniejsza poziom cytokin szlaku Th2 oraz zwiększa poziom limfocytów T_{reg} w płucach (Pellaton et al., 2012b). W badaniach na myszach uwrażliwionych na pyłek brzozy wykazano, że podanie donosowe żywych szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG redukowało alergiczny stan zapalny poprzez obniżenie poziomu cytokin IL-13 i IL-5 oraz spadek eozynofilii w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym (Spacova et al., 2019). Badania na tkankach pobranych od pacjentów chorujących na przewlekłe zapalenie błony śluzowej nosa i zatok oraz zdrowych osób wykazało, że stosowanie preparatu zawierającego *L. casei* AMBR2 poprawia funkcjonowanie błony śluzowej poprzez odtworzenie struktur białek ścisłych połączeń. Ponadto podanie tego szczepu myszom, u których wywołano zapalenie błony nosowej poprzez donosowe podanie IL-4, odwraca spadek integralności błony oraz wpływa na ekspresję zoludyny-1 i okludyny (Martens et al., 2021). Podsumowując, badania wskazują, że preparaty probiotyczne podawane donosowo mogą wpływać pozytywnie na alergiczny stan zapalny w przestrzeniach przynosowych poprzez zróżnicowane działania takie jak okresową kolonizację i oddziaływanie na komórki immunologiczne oraz na przepuszczalność bariery nabłonkowej. Jednym z atutów podawania bakterii donosowo wydaje się być ominięcie żołądka i niskiego pH, jakie w nim panuje (Pellaton et al., 2012a). Ponadto podanie donosowe skutkuje podaniem preparatu w bezpośrednie miejsce stanu zapalnego, umożliwiając szybsze i silniejsze działanie. Umożliwia też podanie znacznie mniejszej ilości bakterii niż w przypadku doustnej formy podania.

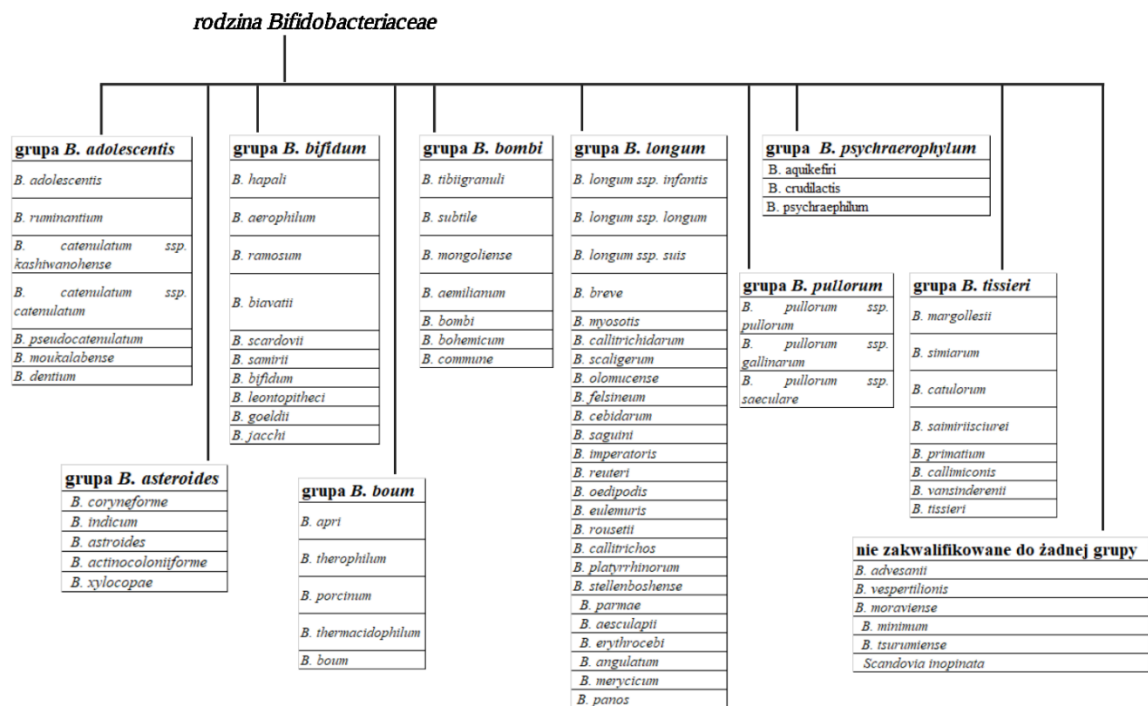
5.3 CHARAKTERYSTYKA BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* należą do rodziny *Bifidobacteriaceae*, rzędu *Bifidobacteriales* i gromady *Actinobacteria* (Mattarelli and Biavati, 2018). Ich klasyfikacja została oparta na podstawie badań sekwencji 16S RNA. Charakteryzują się występowaniem dużej ilości (powyżej 47% reszt całego genomu) reszt guanidynowo-cytosynowych (Ventura et al., 2004). Są to pałeczki należące do bakterii Gram-dodatnich, których kształt komórki określany jest mianem bifid, czyli rozgałęzionym lub w kształcie litery Y. Wykazują one wysoki poziom pleomorfizmu w warunkach wzrostu, co oznacza, że jednocześnie w hodowli mogą występować komórki w kształcie pałeczki, bifid czy maczug (Bergey et al., 2012; Dhanashree et al., 2017). Bakterie te nie tworzą przetrwalników, są nieruchliwe i nie produkują katalazy. *Bifidobacterium* należą do bakterii beztlenowych lub mikroaerofilnych (Bergey et al., 2012).

Podstawową metodą identyfikacji *Bifidobacterium* jest hodowla bakterii na selektywnych podłożach mikrobiologicznych takich jak podłoże De Man, Rogosa i Sharpe (MRS), czy Wilkins-Chalgren. Pożywki te są zwykle dodatkowo modyfikowane poprzez suplementację

węglowodanami takimi jak laktoza, czy galaktoza oraz antybiotykami (np. neomycyna, kanamycyna, mupirocyna) lub aminokwasami (np. L-cysteina-HCl, chlorek litu) (Lugli et al., 2019; Novakova et al., 2016). Szczepy *Bifidobacterium* sprawdza się na obecność unikalnego enzymu fosfoketolazy fruktozo-6-fosforanowej (Modesto et al., 2021). Jest on kluczowym enzymem reakcji rozkładu heksoz do erytrozo-4-fosforanu, którego końcowym produktem są SCFA takie jak octan i mleczan (Pokusaeva et al., 2011). Reakcje tą określa się mianem „*Bifidobacterium* shunt” i jest ona charakterystyczna dla tych bakterii (Alessandri et al., 2021; Mattarelli and Biavati, 2018; Scardovi and Trovatielli, 1965).

Bifidobacterium po raz pierwszy zostały wyizolowane z kału niemowląt karmionych mlekiem matki w 1899 roku przez pediatrę Henriego Tisseira i nazwane *Bacillus bifidus* (Tissier, 1899, 1900). Później nazwę tę zmieniono na *Bacteroides bifidus*, a od 1934 roku klasyfikowano je jako *Lactobacillus bifidus* (Weiss and Rettger, 1938). Obecnie bifidobakterie klasyfikowane są jako odrębny rodzaj obejmujący 94 taksony z 82 gatunkami i 12 podgatunkami (**Rycina 4**) (Duranti et al., 2021; Modesto et al., 2019). Obecność tych bakterii zaobserwowano w układzie pokarmowym wielu ssaków, ptaków, ryb i owadów (Kopečný et al., 2010; Praet et al., 2015), jak również w ludzkiej krwi (Hoyles et al., 2002), ściekach (Biavati et al., 1982), czy sfermentowanym mleku (Watanabe et al., 2009). Genetycznymi markerami wykorzystywanymi do identyfikacji bifidobakterii są geny *clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaJ1*, *purF*, i *rpoC* (Cooper and Feil, 2004; Stackebrandt et al., 2002). Ponadto zidentyfikowano również 261 klastrów genów ortologicznych, występujących we wszystkich opisanych do tej pory szczepach i określono je jako tzw. bifidobakteryjny rdzeń genomowy (Lugli et al., 2019). Dzięki stworzeniu takiej biblioteki bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* podzielono na 10 klastrow: *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. bombi*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. psychraerophilum* i *B. tissieri* (Alessandri et al., 2021). Z czego do najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie należą *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* i *B. pseudolongum* (Milani et al., 2017b). W organizmie dorosłego człowieka najczęściej identyfikowanymi szczepami są *B. bifidum*, *B. breve* i *B. longum* (Duranti et al., 2017), a w okresie niemowlęcym *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* i *B. adolescentis* (Turroni et al., 2012). Ilość poznanych i scharakteryzowanych szczepów *Bifidobacterium* z roku na rok wzrasta, gdyż nowe techniki ułatwiają ich identyfikację bez konieczności ich hodowli (Duranti et al., 2019; Modesto et al., 2019, 2021).



Rycina 4 Zestawienie scharakteryzowanych szczepów *Bifidobacterium* opisanych w literaturze (Alessandri et al., 2021)

5.4 ROLA *BIFIDOBACTERIUM* W ROZWOJU UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO CZŁOWIEKA

Bifidobacterium w organizmie człowieka występują przede wszystkim w jelicie grubym, gdzie ich ilość może sięgać 10^9 - 10^{10} CFU/g zawartości jelita. Ilość tych bakterii w jelitach dzieci karmionych mlekiem matki i urodzonych naturalnie może stanowić nawet do 91% całej mikroflory (Saturio et al., 2021; Turroni et al., 2012). Wspomniany wcześniej „*Bifidobacterium* shunt” umożliwia szczepom *Bifidobacterium* rozkład fruktooligosacharydów w siarze mleka matki oraz mucyn produkowanych w jelitach niemowląt (Arbolea et al., 2018; Sela et al., 2008; Suzuki and Ley, 2020). Jednym z charakterystycznych dla niemowląt szczepów jest *B. longum ssp. infantis*, który w swoim genomie zawiera aż cztery hydrolazy glikozyłowe niezbędne do rozkładu oligosacharydów (Zabel et al., 2020). Co ciekawe obok niego izolowany jest szczep *B. bifidum*, który rozkłada znacznie bardziej złożone cząsteczki oligosacharydów niż *B. longum ssp. infantis* (Kato et al., 2020). Taka ko-egzystencja uniemożliwia innym bakterii zasiedlenie niszy z powodu braku dostępnego źródła węgla (Garrido et al., 2015). Ponadto przekazywanie między różnymi szczepami składników odżywczych (ang. cross-feeding) umożliwia powstawanie złożonych społeczności szczepów *Bifidobacterium* oraz innych dobroczynnych bakterii. Organizm niemowląt nie posiada odpowiednich enzymów takich jak β -glukozydazy, α -fukozydazy czy

β -N-heksozoaminidazy, by rozłożyć złożone oligosacharydy znajdujące się w mleku matki (Suzuki and Ley, 2020). Są one natomiast produkowane przez szczepy *Bifidobacterium*, które rozkładając oligosacharydy dostarczają składników odżywczych niemowlętom (Alessandri et al., 2021; Goodrich et al., 2017).

Ponadto przystosowanie się bifidobakterii do kolonizacji ludzkiego organizmu obejmuje produkcję szeregu białek i enzymów umożliwiających im ochronę przed tlenem, wolnymi rodnikami i kwasami żółciowymi (Brioukhanov and Netrusov, 2004; Ruiz et al., 2012b) takich jak reduktaza wodoronadtlenku alkilu produkowana przez *B. longum* NCC2705 (Ruiz et al., 2012a), czy peroksydaza tioredoksynowa i oksydaza NADH występująca np. u *B. animalis* ssp. *lactis* (Zuo et al., 2014). Szereg transporterów błonowych kodowanych w genomie bifidobakterii chroni je przed niskim pH żołądka. Co więcej dostosowują one również skład lipidowy swojej błony komórkowej, modyfikują struktury peptydoglikanu w zależności od warunków zewnętrznych takich jak zmiany pH, stres osmotyczny czy oksydacyjny (Matsumoto et al., 2004; Wei et al., 2019). Podobne mechanizmy ochronne zostają uruchamiane przy kontakcie bakterii z kwasami żółciowymi (Ruiz et al.; Xu et al., 2019), gdzie dochodzi do wytwarzania specyficznych egzopolisacharydów, białek czy zewnątrzkomórkowego DNA (Kelly et al., 2020).

W czasie rozwoju człowieka, mikroflora jelit staje się bardziej zróżnicowana co skutkuje spadkiem ilości *Bifidobacterium* (między innymi *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* i *B. longum* ssp. *infantis*) do około 3-7% całej mikroflory przy równoczesnym wzroście ilości mikroorganizmów z innych gromad takich jak *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Arbolea et al., 2016; Milani et al., 2017a). U osób starszych dochodzi do prawie całkowitego zaniku szczepów *Bifidobacterium*, co może być przyczyną występowania chorób o podłożu autoimmunologicznym i gastrycznym takich jak zaburzenia perystaltyki jelit, zapalenia czy raka żołądka (Devi et al., 2021; Sun et al., 2019). Charakterystycznymi szczepami występującymi u osób starszych są *B. adolescentis*, *B. catenulatum* i *B. longum* ssp. *longum* (Claesson et al., 2011).

5.5 PROBIOTYCZNE WŁAŚCIWOŚCI SZCZEPÓW *BIFIDOBACTERIUM*

Szczepy *Bifidobacterium* promują powstawanie fizjologicznej i immunologicznej homeostazy jelitowej oraz modulują rozwój błony śluzowej i produkcję śluzu. Brak lub eradykacja *Bifidobacterium* u noworodków została powiązana z wystąpieniem otyłości, astmy, alergii bądź innych chorób o podłożu autoimmunologicznym w późniejszym okresie życia (Alm et al., 2008; Marra et al., 2006; Nogacka et al., 2018). Obniżoną ilość szczepów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* zidentyfikowano u osób z zespołem jelita drażliwego (IBS) (Liu et al., 2017; Priya et al., 2022), oraz u chorych na wrzodziejące zapalenie okrężnicy (Duranti et al., 2016). Badania wskazują na korelację wysokiej ilości tych bakterii z mniejszą częstotliwością występowania zapalenia jelit i żołądka, atopowego zapalenia skóry i alergii u niemowląt (Fujimura et al., 2016; O'Mahony et al.,

2005; Zanotti et al., 2015). Regularne przyjmowanie wybranych szczepów *Bifidobacterium* może złagodzić lub wyeliminować objawy bakteryjnej dysbiozy układu pokarmowego (Ventura et al., 2012).

W badaniach *in vitro* prowadzonych na ludzkich komórkach dendrytycznych pochodzących z monocytów wykazano, że niektóre żywe gatunki *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* i *B. animalis* ssp. *lactis*) są w stanie stymulować komórki dendrytyczne do dojrzewania i produkcji cytokin takich jak IL-12, IL-10, TNF- α i IL-1 β (López et al., 2010). Badania na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) wykazały, że szczepy *B. bifidum* (IF 10/10, A8 i L22) są słabymi induktorami szlaku Th1, jednak indukcją szlak Th17 (López et al., 2010). Ponadto w zależności od badanego szczepu obserwuje się zróżnicowane właściwości immunomodulujące regulujące poziomy cytokin tj. IL-10, TNF- α , IFN- γ i IL-2 (Medina et al., 2007). Badania nad właściwościami *B. longum* KABPB042 z wykorzystaniem komórek nabłonkowych Caco-2 wykazały, że bardzo efektywnie przylegają one do komórek nabłonka (około 70% komórek bakteryjnych) indukując równocześnie produkcję dużej ilości białek ścisłych połączeń takich jak okludyna-1, kładyna 1 czy transporterów serotoninowych (Astó et al., 2022).

Badania na myszach z autofagią wywołaną podaniem lipopolisacharydu (LPS) *E. coli* O111:B4, którym następnie podano wybrane szczepy bifidobakterii wskazują, że bakterie zmniejszają stan zapalny oraz chronią zdrowe komórki nabłonka jelitowego (Han et al., 2016). Podawanie myszom ekstraktu z nasion brokułu i *B. longum* CCF1206 prowadziło do produkcji przez te bakterie aktywnych związków sulforanowych, które wpływają na zmniejszenie stanu zapalnego w modelu zapalenia jelita wywołanego podaniem soli sodowej siarczanu dekstranu (DSS) (Wu et al., 2023). Nowe badania wskazują, że szczepy takie jak *B. adolescentis* PRL2019 i *B. adolescentis* HD17T2H (Duranti et al., 2020) mają również znaczący wpływ na rozwój układu nerwowego poprzez produkcję neurotransmiterów tj. GABA, serotoniny, czy acetylocholin (Duranti et al., 2020; Luck et al., 2020; Rutsch et al., 2020), co z kolei wpływa na zmniejszenie występowania stanów lękowych (Pinto-Sanchez et al., 2017). W kale i mózgu myszy skolonizowanych szczepami *Bifidobacterium dentum* zaobserwowano podwyższony poziom niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania organizmu aminokwasu - tyrozyny (Luck et al., 2021).

Badania dotyczące niemowląt wskazują, że podawanie im szczepów takich jak *B. longum* ssp. *infantis* EVC001, skutkuje zmianą polaryzacji limfocytów T z Th2 do Th1 oraz wyższą produkcją SCFA w porównaniu z grupą kontrolną. Obecność bifidobakterii u dzieci zwiększa ilość nieklasycznych monocytów (określanych często jako przeciwwzapalne), limfocytów Foxp3⁺ T_{reg} oraz cytokin IL-27, IL-10, IL-1RA oraz IL-6 (Henrick et al., 2021). Z kolei podawanie 3-miesięcznym dzieciom *B. breve* skutkuje zmniejszeniem ryzyka wystąpienia egzemy w późniejszym okresie (Ismail et al., 2016). Ze względu na właściwości pro-zdrowotne wybrane szczepy *Bifidobacterium* są powszechnie wykorzystywane jako suplementy diety (Aloisio et al.,

2018; Quagliariello et al., 2016). Szczep *B. lactis* B94 (Maflor®), stosowany jest u dzieci w terapii przeciwko infekcji *Helicobacter pylori*. Obniża on ryzyko zasiedlenia organizmu przez bakterie chorobotwórcze oraz ogranicza lub całkowicie eliminuje skutki uboczne terapii tj. ból, wymioty czy biegunka (Sirvan et al., 2017). Korzystny efekt *B. lactis* B94 (Maflor®) zaobserwowano również w leczeniu infekcji gastroenterologicznych wywołanych przez rotawirusy (Erdoğan et al., 2012). *Bifidobacterium breve* wyizolowany ze stolców dzieci w wieku od 3 dni do 5 lat wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko enteropatogennym szczepom *Klebsiella* i *Salmonella* sp. (Delcaru et al., 2016). W pierwszym roku życia dużo dzieci cierpi na funkcjonalne zaburzenia żołądkowo-jelitowe, których objawy można uśmierzyć stosując preparat zawierający *B. longum* KABBP042 i *Pediococcus pentosaceus* KABP041 (Astó et al., 2022). Zaobserwowano również, że obecność szczepów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* znacznie zmniejsza objawy występujące przy zakażeniu *Plasmodium* sp. wywołującego u ludzi malarię (Ippolito et al., 2018). Szczepy te chronią przed infekcjami innymi pasożytami takimi jak *Cryptosporidium parvum*, czy *Strongyloides venezuelensis* (Leung et al., 2018). Badania prowadzone na starszych pacjentach (w wieku 69 - 80 lat) wykazały, że podanie niektórych szczepów bifidobakterii indukuje u nich produkcję działających przeciwwirusowo IFN- α (Arunachalam et al., 2000) i IFN- γ oraz cytokin IL-2, IL-5 i IL-10 (Spaiser et al., 2015).

Większość mechanizmów działania szczepów probiotycznych *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* oparte jest o aktywację receptora TLR2. Receptor ten działa tylko w kompleksie z dwoma innymi receptorami TLR1 lub TLR6. Dimerowi TLR2/TLR1 przypisuje się głównie właściwości pro-zapalne, które związane są z produkcją cytokin takich jak IL-12 i IL-17. Z kolei dimer TLR2/TLR6 może posiadać właściwości regulatorowe indukując produkcję IL-10 (Ren et al., 2016). W pracy Paveljšek i współp. można znaleźć informacje, że głównym receptorem aktywowanym przez szczep *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* IM386 jest receptor TLR2/TLR6, który uruchamia kaskadę sygnałową NF- κ B w sposób zależny od stężenia. Ponadto wykazali, że receptor TLR10 może również być aktywowany przez szczepy bifidobakterii na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Równoczesna aktywacja receptora TLR10, TLR2 i TLR6 przy stosunku receptorów w komórce 1:1:1 hamuje aktywność kaskady NF- κ B o 80% (Paveljšek et al., 2021). Co ciekawe do tej pory zidentyfikowano tylko kilka ligandów receptora TLR10 znajdujących się w wirusach lub patogennych bakteriach (Sartorius et al., 2021).

5.6 RÓŻNICE MIĘDZY PROBIOTYKAMI A POSTBIOTYKAMI

Probiotyki, czyli „żywe mikroorganizmy”, których regularne przyjmowanie ma dobroczynny wpływ na zdrowie człowieka znane są ludziom od dawna w postaci kiszonek i jogurtów. Nasza świadomość dotycząca ich niebagatelnej roli dla naszego organizmu wzrosła znacząco w ostatnich latach. Liczba publikacji skupiających się na badaniu właściwości oraz

możliwościach wykorzystania probiotyków przekracza rocznie ponad 500 pozycji (Day et al., 2019).

Do tej pory opisano szereg właściwości pro-zdrowotnych jakie przyjmowanie szczepów należących do bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *E. coli* Nissle, *Bifidobacterium* czy *Saccharomyces* ma na organizm człowieka (George Kerry et al., 2018). Należy tutaj wspomnieć, że specyficzne właściwości pro-zdrowotne są zależne od szczepu, a nie rodzaju bakterii (López et al., 2010). Szczep aby mógł zostać zakwalifikowany jako probiotyczny powinien spełniać szereg kryteriów takich jak: I) być dokładnie zidentyfikowany i opisany; II) przejść przez badania sprawdzające jego bezpieczeństwo dla organizmu, a mechanizm działania powinien zostać opisany; III) przejść pozytywnie próby na modelach zwierzęcych; IV) przejść badania na grupach ludzi i wykazywać swoje właściwości w porównaniu z grupą placebo; V) być odporny na warunki jakie stosowane są podczas procesów technologicznych; VI) wykazywać przeżywalność podczas transportu przez przewód pokarmowy; VII) powinien być nieszkodliwy dla człowieka oraz nie wykazywać cech antybiotykoporności (Hill et al., 2014). Wiele szczepów *Bifidobacterium* pomimo spełnienia większości tych wymagań nie są bakteriami, które można w łatwy sposób zaadoptować do technologicznych procesów produkcji probiotyków, ponieważ są bezwzględnie beztlenowcami. Wzrastają przez to koszty produkcyjne, a ponadto trudno ocenić ile bakterii przeżyje do momentu konsumpcji przez człowieka. Sprawia to, że bifidobakterie są mniej atrakcyjne przy opracowywaniu preparatów probiotycznych (Salminen et al., 2021). Należy również zwrócić uwagę na niebezpieczeństwa jakie mogą być związane z przyjmowaniem preparatów zawierających żywe bakterie. Szczególnie ważne jest to przy podawaniu tych preparatów osobom z osłabionym lub niewykształconym układem odpornościowym (Esaiassen et al., 2017; Lee and Kim, 2022; Weber et al., 2015). W literaturze znajdują się prace opisujące wystąpienie sepsy po podaniu preparatu probiotycznego zawierającego szczep *Bifidobacterium* u dziecka z ostrą białaczką limfoblastyczną (Avcin et al., 2015) czy bakteriemii u wcześniaków (Bertelli et al., 2015). Ponadto badania na niektórych szczepach bifidobakterii wykazały, że mogą one wykazywać oporność na antybiotyki (Xu et al., 2018). W szczepie *B. longum* KABP042 za pomocą analizy *in silico* wykryto geny oporności na erytromycynę i klindamycynę (Astó et al., 2022), a geny oporności na tetracyklinę znaleziono w szczepach *B. animalis* ssp. *lactis* (BB-12, Bi-07, Bi-04, HN019) (Rozman et al., 2020).

Obecnie wiadomo, że aby uzyskać efekt pro-zdrowotny bakterie nie muszą być podawane w postaci żywych mikroorganizmów. W 2021 roku The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) wprowadziła termin postbiotyk dla określenia produktów zawierających inaktywowane bakterie probiotyczne i/lub ich części/produkty przemiany materii, które mają korzystne właściwości zdrowotne. Synonimami tego słowa w literaturze są parabiotyk, parapsychobiotyk, "ghost" probiotyk, probiotyki tyndalizowane czy lizaty bakteryjne (Salminen et al., 2021). Do momentu opublikowania pracy w 2021 roku terminem postbiotyk często określane

były tylko rozpuszczalne cząsteczki/frakcje wyizolowane lub produkowane przez żywe bakterie. Z kolei termin parabiotyku opisywał inaktywowane lub niezdolne do podziału bakterie, których ściana komórkowa nie została naruszona (Aguilar-Toalá et al., 2021; Cuevas-González et al., 2020).

Do podstawowych technik inaktywacji bakterii należą wysoka temperatura, ciśnienie, sonikacja, działanie ultrafioletem, napromieniowanie czy wykorzystanie związków chemicznych takich jak formaldehyd czy lizozym. Ich zastosowanie uszkadza podstawowe struktury komórki takie jak białka (np. denaturacja), lipidy, cukry czy DNA. Może prowadzić do przzerwiania ciągłości błony komórkowej (de Almada et al., 2016b), zahamowania procesów podziału lub całkowitego uśmiercenia bakterii. Badając właściwości inaktywowanych bakterii należy pamiętać by tak zoptymalizować metodę inaktywacji, aby nie doszło do zniszczenia ściany komórkowej bakterii. Taddese i współp. w swoich badaniach opisali szereg technik i protokołów wykorzystywanych do otrzymywania inaktywowanych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Termiczna inaktywacja okazała się jedną z najlepszych technik do uzyskania postbiotyku. Środki takie jak etanol, wodorotlenek sodu, czy formalina uszkadzają podstawowe elementy struktur zewnętrznych ściany komórkowej, a czasem prowadzą nawet do utraty jej ciągłości (Taddese et al., 2018). Równocześnie należy mieć na uwadze, że wybrana metoda musi doprowadzić do całkowitej inaktywacji, czyli uśmiercenia komórki bądź wprowadzenia ją w stan trwale wegetatywny. W kolejnej pracy Taddese i współp. wykazali, że przy wyborze techniki należy dokładnie rozpatrzyć dalsze etapy badań do jakich posłużą inaktywowane bakterie oraz starannie dobrać warunki procesu względem badanego szczepu (Taddese et al., 2021). Wykorzystanie środków chemicznych często wiąże się ze zmianami strukturalnymi w białkach lub uwolnieniem ich ze ściany/błony komórkowej (Otzen et al., 2007). Z kolei pod wpływem sonikacji ultradźwiękowej w pożywce bakteryjnej dochodzi do powstawania pęcherzyków, które w kontakcie z powierzchnią bakterii tworzą regiony o bardzo wysokiej temperaturze i wysokim ciśnieniu, skutkując uśmierceniem komórki poprzez miejscowe inaktywacje struktur zewnętrznych (Piyasena et al., 2003). Biorąc pod uwagę, że głównym celem badań nad postbiotykami jest ich wykorzystanie w preparatach przeznaczonych dla ludzi, termiczna inaktywacja wydaje się najlepszą metodą do inaktywacji bakterii. Ponadto wykorzystanie termicznie inaktywowanych bifidobakterii powinno pomóc w rozwiązaniu części problemów technologicznych napotykanym przy produkcji preparatów zawierających te szczepy, a także wyeliminować ryzyko wystąpienia bakteriemii. Potrzeba jednak większej ilości badań by można to było jednoznacznie zweryfikować czy takie inaktywowane szczepy nadal posiadają korzystny dla organizmu efekt (Morniroli et al., 2021; Szajewska et al., 2022).

Termicznie inaktywowany szczep *B. longum* CEST-7347 redukuje poziom cytokin prozapalnych w komórkach nabłonka jelitowego HT-29 (Martorell et al., 2021), a stymulacja 10^9 CFU/ml termicznie inaktywowanych szczepów *B. bifidum* MG731, *L. reuteri* MG5346, *L. rhamnosus* MG316 i *L. rhamnosus* MG5200 indukuje apoptozę w ludzkich liniach nowotworów

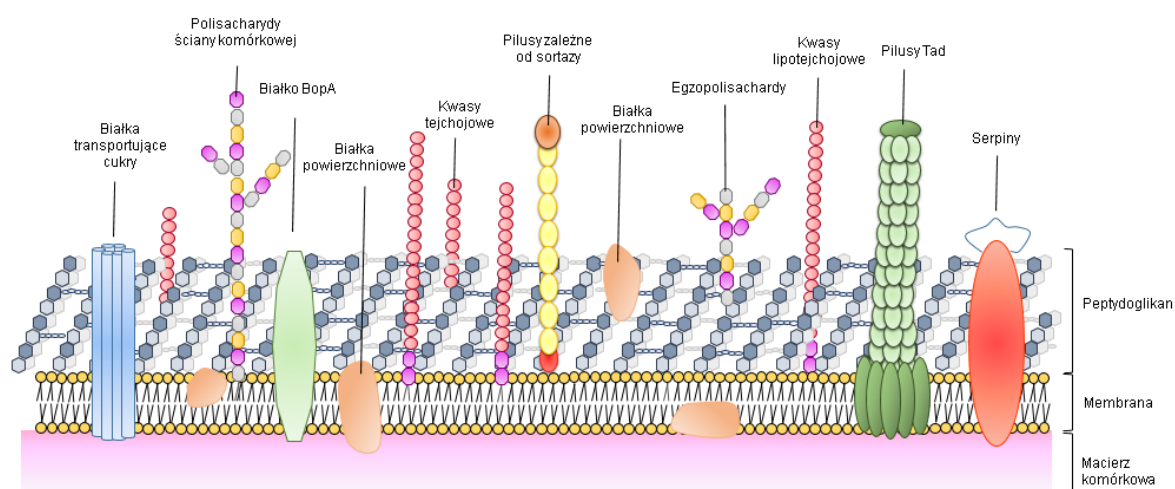
układu pokarmowego. Wyniki te potwierdzono *in vivo* w humanizowanych myszach, którym wszczepiono komórki raka gruczolakowatego żołądka MKN1 (Kim et al., 2022). Badania mające na celu ocenę efektywności *B. bifidum* BGN4 w leczeniu zapalenia jelit i choroby Leśniowskiego-Croha wykazały, że mniejszy spadek wagi ciała u myszy Balb/c zaobserwowano po podaniu termicznie inaktywowanych (HT) lub traktowanych lizozymem (LYS) bifidobakterii niż żywych bakterii. Ponadto myszy z grupy LYS charakteryzowały się znacznie lepszą szczelnością błony jelitowej (Lee et al., 2022). Badania nad termicznie zabitymi *B. bifidum* B1628 w modelu zapalenia jelit u myszy wykazały, że szczep ten zmniejsza obszar zapalenia oraz ilość cytokin pro-zapalnych, wpływa również na zwiększenie liczby bakterii z grupy *Lactobacillus* (Feng et al., 2022). Nie zawsze jednak inaktywowane bakterie wykazują te same właściwości immunomodulujące co żywe bakterie, ponadto czasem może dojść do ich całkowitej utraty (Santos et al., 2021). W przypadku szczepu *B. longum* ssp. *lungum* 51A wykazano, że hamuje on odpowiedź alergiczną przeciw owoalbuminie poprzez zredukowanie poziomu cytokin szlaku Th2 i przeciwciał IgE oraz indukcję IL-10. Podanie termicznie inaktywowanego szczepu nie powoduje jednak żadnych zmian w poziomach przeciwciał IgE i wydzielniczych IgA (sIgA) w porównaniu do myszy, którym podano tylko OVA (Santos et al., 2021). W przypadku szczepu *L. plantarum* WCFS1 po termicznej inaktywacji dochodzi do znacznego zmniejszenia zdolności rozpoznawania ligandów powierzchniowych tego szczepu przez receptor TLR2 (Paveljšek et al., 2021).

Współcześnie obserwowany jest również intensywny rozwój badań nad właściwościami cząsteczek efektorowych bakterii, które mogą być odpowiedzialne za korzystny efekt obserwowany dla całej komórki bakteryjnej. Badania skupiają się na ekstraktach komórkowych, antygenach powierzchniowych lub produktach metabolizmu bakterii (Górska et al., 2016; Ruas-Madiedo et al., 2006; Speciale et al., 2019). Lee i współp. wykazali, że stymulacja linii makrofagów RAW264.7 przez całe komórki, ekstrakt komórkowy bez ściany komórkowej, oczyszczoną ścianą komórkową i pożywkę pochodzącą z *B. bifidum* BGN4 wywołuje bardzo zróżnicowaną odpowiedź immunologiczną. Żywe komórki indukują wyższą produkcję TNF- α , a ekstrakt komórkowy podwyższa poziom IL-6 w porównaniu do pozostałych grup (Lee et al., 2002). A w kolejnej pracy wykazano, że enzymatycznie zlizowane komórki *B. bifidum* BGN4 zmniejszają poziom pro-zapalnych cytokin takich jak IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α produkowanych przez komórki RAW 264.7 stymulowane LPS (Lee et al., 2021). Do podobnych wyników doszli Kim i Ji, którzy wykazali że ekstrakt komórkowy z *B. bifidum* BGN4 zwiększa właściwości fagocytarne makrofagów w porównaniu do makrofagów stymulowanych całymi bakteriami (Kim and Ji, 2006). Komponenty ściany komórkowej szczepów *B. longum* ATCC 15707 i BIF53 uzyskane w wyniku sonikacji hodowli komórkowej indukowały znacznie wyższy poziom IFN- γ i IL-2 w komórkach PBMC niż w przypadku stymulacji żywymi bakteriami (Medina et al., 2007). Badania *in vitro* na liniach nowotworowych takich jak HT-29 i Caco-2 wykazały, że związki produkowane przez niektóre

szcypy *B. adolescentis* mogą mieć apoptotyczne właściwości i hamować proliferację komórek (Faghfoori et al., 2021).

5.7 ANTYPYGENY POWIERZCHNIOWE *BIFIDOBACTERIUM*

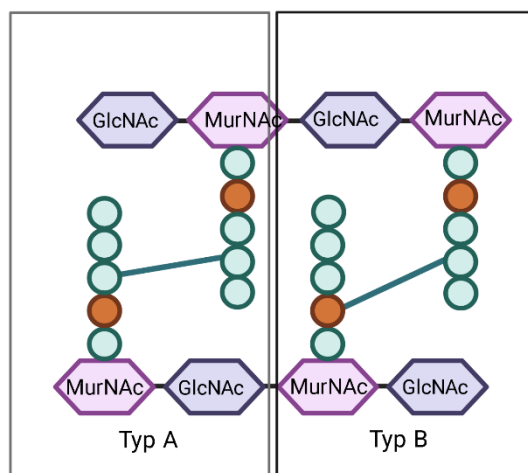
W literaturze znajduje się szereg prac skupiających się na charakterystyce antypogenów powierzchniowych wybranych szczepów *Bifidobacterium* takich jak egzopolisacharydy, polisacharydy ściany komórkowej, kwasy lipotejchajowe, glikolipidy, peptydoglikan i białka powierzchniowe wraz z opisem ich właściwości immunomodulujących (**Rycina 5**).



Rycina 5 Schemat ściany komórkowej szczepów *Bifidobacterium* wraz z antypogenami powierzchniowymi obecnymi na jej powierzchni (Pyclik et al., 2020)

5.7.1 Peptydoglikan

Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich składa się przede wszystkim z peptydoglikanu. W zależności od szczepu *Bifidobacterium* stanowi on 30-70% wszystkich składników ściany komórkowej. Podstawowymi składnikami peptydoglikanu są N-acetyloglukozamina (GlcNAc) i kwas N-acetylmuraminowy (MurNAc) połączone wiązaniami β -1,4-O-glikozydowymi, które tworzą długi łańcuch polisacharydowy (Schumann, 2011). Polisacharyd ten usieciowany jest peptydowymi łańcuchami tworzącymi trójwymiarową i sztywną strukturę. Oprócz typowych aminokwasów występujących w białkach znajdują się w nim też inne aminokwasy takie jak L-ornityna (Veerkamp, 1971). Bakterie Gram-dodatnie charakteryzują dwoma typami struktur peptydoglikanu oznaczonymi jako A i B (**Rycina 6**) (Schumann, 2011), jednak do tej pory w szczepach *Bifidobacterium* zidentyfikowano wyłącznie typ A peptydoglikanu, który co ciekawe często występuje również u bakterii patogennych (Mattarelli and Sgorbati, 2018).



Rycina 6 Dwa typy budowy peptydoglikanu scharakteryzowane w bakteriach. Łańcuch peptydowy złożony jest z podjednostek (zaczynając od wiązania z MurNAc) L-Ala – D-Glu –L-Lys/L-Orn-D-Ala-(D-Ala) (Schleifer and Kandler, 1972).

Peptydoglikan A charakteryzuje się występowaniem wiązania między grupą karbonylową D-alaniny w pozycji 4, a wolną grupą aminową aminokwasu będącego w pozycji 3 diaminokwasu, (Schleifer and Kandler, 1972). W grupie A wyróżnia się 4 podtypy: A1, A2, A3 i A4. Pierwszy z nich cechuje się występowaniem bezpośredniego wiązania pomiędzy łańcuchami peptydowymi. Podtyp A2 powstaje, gdy w łańcuchu peptydowym występują rozgałęzienia. Obecność mostku złożonego z dwóch do siedmiu reszt karboksylowych L-aminokwasów, glicyny lub obu tych cząsteczek określane jest jako podtyp A3. Ostatni podtyp wyróżnia się obecnością aminokwasów zawierających dwie reszty karboksylowe. Co więcej rozróżnia się formy α , β i γ , które opisują aminokwasy bezpośrednio biorące udział w tworzeniu łańcucha. W przypadku formy α , aminokwasem tym jest lizyna, w formie β to L-ornityna (L-Orn), a γ to kwas diaminopimelinowy (Schleifer and Kandler, 1972; Schumann, 2011).

Tabela 1 Typy łańcuchów peptydowych łączących jednostki polisacharydowe w peptydoglikanie zidentyfikowane w szczepach *Bifidobacterium* (Mattarelli and Biavati, 2018)

GATUNEK	TYP POŁĄCZENIA	TYPY ŁAŃCUCHÓW PEPTYDOWYCH
<i>B. astereoides</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. reuteri</i> , <i>B. saguini</i>	A1 α	L-Lys, Gly (podstawia grupę α karbonylową D-Glu)
<i>B. catenulatum</i> , <i>B. magnum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. hapali</i>	A3 α	L-Lys/L-Orn-L-Ala-L-Ala-L-Ser
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>B. choerinum</i> , <i>B. cuniculi</i> , <i>B. ruminantium</i>		L-Lys/L-Orn-L-Ser-(L-Ala)-L-Ala-L-Ala
<i>B. anugulatum</i> ,	A4 α	L-Lys-D-Asp

<i>B. coryneforme</i> , <i>B. gallinarum</i> , <i>B. indicum</i> , <i>B. mangoliense</i> , <i>B. pullorum</i> , <i>B. stellenboschense</i> , <i>B. callitrichos</i>		
<i>B. adolescentis</i> , <i>B. dentium</i> , <i>B. merycicum</i> , <i>B. saeculare</i> , <i>B. stellenboschense</i> , <i>B. callitrichos</i>		L-Lys/L-Orn-D-Asp
<i>B. pseudolongum ssp.</i> <i>pseudolongum</i> , <i>B. pseudolongum ssp.</i> <i>globosum</i>	A3 β	L-Orn/L-Lys-L-Ala-L-Ala (-L-Ala)
<i>B. longum ssp. longum</i> , <i>B. longum ssp. infantis</i> , <i>B. longum ssp. suis</i> , <i>B. longum ssp. suillum</i> , <i>B. lemurum</i>		L-Orn-L-Ser-L-Ala-L-Thr-L-Ala
<i>B. ramosum</i>		L-Orn-L-Ser-L-Ala
<i>B. bifidum</i> , <i>B. myosotis</i>	A4 β	L-Orn-D-Ser-D-Asp
<i>B. avesanii</i>		L-Orn-(L-Lys)-D-Ser-D-Glu

Główną i najważniejszą funkcją peptydoglikanu jest tworzenie/zapewnienie mechanicznej osłony chroniącej bakterie przed zmianami ciśnienia osmotycznego oraz zmianami pH w środowisku zewnętrznym (Vollmer et al., 2008). Peptydoglikan u ssaków rozpoznawany jest przez receptory wewnątrzkomórkowe NOD1, NOD2 (NOD nucleotide-binding oligomerization domain proteins - domena oligomeryzacji wiążąca nukleotyd) i inflamasom NLRP3 zawierający domenę pirynową z rodziny NLR (Moreira and Zamboni, 2012; Wolf and Underhill, 2018a). Receptory NOD rozpoznają tylko fragmenty peptydoglikanu, które zostały rozłożone przez różne enzymy znajdujące się w cytozolu komórki. Dipeptyd kwasu D-glutaminowego i kwasu mezo-diaminopimelinowego (mDAP, obecny przede wszystkim u bakterii Gram-ujemnych) rozpoznawany jest przez receptor NOD1. Di- tri- bądź tetrapeptyd zawierający przynajmniej kwas N-acetylmuraminowy (MurNAc) aktywuje NOD2 (Irazoki et al., 2019). Z kolei aktywacja inflamasomu zapoczątkowana jest najprawdopodobniej przez wiązanie się zhydrolizowanych monomerów cukrowych N-acetyloglukozaminy ze znajdującą się w cytozolu heksokinazą (Wolf et al., 2016). Peptydoglikan rozpoznawany jest również przez białka rozpoznające peptydoglikan

(PGRPs, peptidoglycan recognition proteins) (Dziarski and Gupta, 2006). U ssaków obecnie scharakteryzowano cztery białka należące do tej rodziny PGRP opisane jako PGLYRP-1/2/3/4, które zidentyfikowano na powierzchni makrofagów, neutrofilów, eozynofili, komórek wątroby czy nabłonka. Białka PGRP rozpoznają zarówno peptydoglikan bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych (Wheeler et al., 2014). Oprócz właściwości bakteriobójczych i bakteriostatycznych, niektóre białka z tej rodziny wykazują dodatkowe funkcje. Białko PGLYRP2 wykazuje aktywność amidazy N-acetylmuramyl-L-alaninowej, która hydrolizuje wiązanie między MurNAc, a L-alaniną (Dziarski and Gupta, 2006). W badaniach modelu zapalenia jelit wywołanego DSS wykazano, że obecność tej rodziny białek reguluje zróżnicowanie mikroflory jelitowej. Ponadto w badaniach tych wykorzystano mysie modele, w których badano delecję poszczególnych białek PGLYRP-1/2/3/4. Wyniki wykazały, że myszy z delecją PGLYRP 3^{-/-} wykazywały największy stan zapalny. U wszystkich myszy z delecjami wykazano znaczny spadek masy ciała oraz podwyższony poziom cytokin pro-zapalnych (Saha et al., 2010). Pierwsze prace dotyczące rozpoznawania peptydoglikanu wskazywały, że bakteryjny peptydoglikan może być rozpoznawany również przez receptor TLR2 (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). Kolejne prace jednak podważały te wyniki wskazując, że aktywacja tego receptora spowodowana była głównie występowaniem pozostałości innych antygenów powierzchniowych takich jak kwasy lipoteichojoyowe, czy polisacharydy (Travassos et al., 2004). Niemniej jednak, kolejne prace ponownie wskazywały, że w przypadku peptydoglikanu bakterii Gram-ujemnych, który zawiera kwas meso-diaminopimelinowy receptor TLR2 jest również odpowiedzialny za rozpoznanie tej cząsteczki (Asong et al., 2009).

Do tej pory niewiele badań skupia się na właściwościach immunomodulujących peptydoglikanu. Peptydoglikan wyizolowany z *Bifidobacterium* indukuje cytokiny TNF- α , IL-6 i produkcję azotynów w linii RAW 264.7 (Wang et al., 2001; Zhu et al., 2011). Co więcej peptydoglikan wyizolowany z *B. breve*, *B. adolescentis* i *B. longum* hamuje proliferację linii nowotworowych takich jak HT-1376, SNUC2A i DLD-1 (Kim et al., 2002). Zahamowanie, a nawet regresję guzów zaobserwowano u myszy z włókniakomięsakiem Meth-A po podaniu zawiesiny inaktywowanych termicznie bakterii *B. longum* ssp. *infantis* i zawiesiny zawierającej fragmenty ściany komórkowej tych bakterii (Sekine et al., 1985). Podanie myszom peptydoglikanu z *B. bifidum* powoduje z kolei apoptozę komórek raka jelita grubego (Li-sheng et al., 1999). W swojej pracy Yoshida i współp. zasugerowali, że peptydoglikan *B. breve* indukuje różnicowanie się naiwnych limfocytów T w kierunku odpowiedzi Th1 i dojrzewanie komórek dendrytycznych u pacjentów chorych na atopowe zapalenie skóry (Yoshida et al., 2010).

5.7.2 Kwasy lipotejchojowe

Kwasy tejchojowe to ujemnie naładowane polimery występujące u większości bakterii Gram-dodatnich. Zazwyczaj składają się one z 30-40 podjednostek zawierających fosforan glicerolu (Gro-P), fosforan rybitolu (Rbo-P) lub fosforan mannitolu, monosacharydy takie jak glukoza, galaktoza i ramnoza oraz aminokwasy np. D-alaninę (Poxton, 2015). Rozróżnia się dwa rodzaje związków należących do tej grupy: 1) kwasy tejchojowe, które są związane kowalencyjnie ze ścianą i 2) kwasy lipotejchojowe, które są luźno zakotwiczone w błonie (Fischer, 1994). W przypadku bakterii, u których ilość zasad cytozynowo-guanidynowych przekracza 50%, kwasy lipotejchojowe zastępowane są przez lipoglikany (Greenberg et al., 1996). Cząsteczki te są liniowymi bądź rozgałęzionymi polisacharydami zawierającymi ugrupowania hydrofilowe, które posiadają ładunek ujemny ponieważ są podstawione fosforanem monoglicerolu. W przypadku *Bifidobacterium* kwasy tejchojowe są jednymi z najmniej poznanych struktur powierzchniowych. Analiza DNA wykazała, że bakterie zawierają geny niezbędne do wytworzenia kwasów tejchojowych oraz lipotejchojowych np. tymidylilotransferazę glukozo-1-fosforanową (BBPR_0078), UDP-N-acetyloglukozaminę-N-acetylomuramylo-(pentapeptyd)pirofosforylo-undekaprenolo-N-acetyloglukozaminę MurG (BBPR_0556), fosfoglukomutazę (BBPR_1512) i transferazę fosfoglicerolową (BBPR_1314) (Colagiorgi et al., 2015). Wyniki badań nad tymi genami wykazały, że są one odmiennie ekspresjonowane w zależności od warunków środowiskowych co oznacza, że ładunek obecny na ścianie komórkowej może się znacząco różnić pomiędzy szczepami hodowanymi w warunkach *in vitro* a tymi, które będą np. rezydować w jelitach gospodarza (Colagiorgi et al., 2015).

Do tej pory opisano kilka struktur LTA wyizolowanych z *Bifidobacterium*. Do bardziej interesujących należą struktury *B. bifidum* (YIT 4007 i YIT 4013), *B. breve* (YIT 4010 i YIT 4014) oraz *B. longum* YIT 4007, które różnią się od siebie ilością grup glukozywych i galaktozowych (Iwasaki et al., 1990). Z kolei w szczepie *B. longum* BIM B-476-D zidentyfikowano aż dwa rodzaje kwasów tejchojowych (**Tabela 2**) (Valueva et al., 2013).

Badania wykazały, że LTA bifidobakterii umożliwia im wiązanie się do komórek nabłonka jelitowego poprzez ich część lipidową (Op Den Camp et al., 1985). Obecnie niewiele wiadomo odnośnie właściwości immunomodulujących kwasów tejchojowych poza tym, że rozpoznawane są one przez heterodimer TLR2/TLR6 (Nilsen et al., 2008). Tylko dwie prace pochodzące z tego samego laboratorium wykazały, że podawanie LTA bifidobakterii w połączeniu z 5-fluorouracylem hamuje wzrost komórek wątrobiaka-22 poprzez regulację ilości komórek limfocytów T_{reg} (Guo et al., 2015a; Xie et al., 2012). Zespół Balaguer z kolei wykazał, że LTA z *B. animalis* ssp. *lactis* BPL1 podawany *C. elegans* powoduje spadek masy ciała u tych organizmów poprzez aktywację szlaku IGF-1 (Balaguer et al., 2022).

Tabela 2 Wybrane struktury kwasów lipotejchojowych zidentyfikowane na powierzchni ściany komórkowej *Bifidobacterium*

SZCZEP	STRUKTURA	ODNOŚNIK
<i>Bifidobacterium longum</i> BIM B-476-D		(Valueva et al., 2013)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> YIT 4007/ YIT 4013, <i>Bifidobacterium breve</i> YIT 4010/ YIT 4014, <i>Bifidobacterium longum</i> YIT 4021		(Iwasaki et al., 1990)

5.7.3 Glikolipidy i fosfolipidy

Cząsteczki polarne tj. glikolipidy i fosfolipidy są obecne na powierzchni bakterii i stanowią bardzo zróżnicowaną grupą związków. W ich strukturze można wyróżnić dwie części: grupę lipidową związaną z glicerolem lub sfingozyną oraz grupę, która może zwierać cząsteczki fosforu lub cukru (Sohlenkamp and Geiger, 2016). Do tej pory niewiele związków lipidowych *Bifidobacterium* zostało opisanych w literaturze. Veerkamp i współp. wykazali, że w ścianie *B. bifidum var pennsylvanicus* dominują pochodne mono- di- i trigalaktozylodiglicerydów (Veerkamp, 1972). W swojej pracy Novik i współp. na podstawie analizy ekstraktów lipidów

szczepów *B. longum* B 379M, *B. bifidum* 791 i *B. adolescentis* 94BIM, wykazali, że skład lipidowy jest odmienny i charakterystyczny dla poszczególnych gatunków bakterii (Novik et al., 2005, 2006).

Timmer i współp. wykazali, że makrofagi wyizolowane ze szpiku kostnego i zróżnicowane do pro-zapalnych makrofagów M1 poprzez stymulację LPS przy równoczesnym podaniu 1-β-D-galaktofuranozylo-3-gliceroplazmalomonoglicerydem pochodzącym z *B. longum* ssp. *infantis* ATCC 15702, produkowały znacznie mniejsze ilości tlenu azotu niż komórki z grupy kontrolnej (Timmer et al., 2014). Uznaje się, że polarne lipidy szczepów *Bifidobacterium* są rozpoznawane przez receptory TLR2/TLR1 i TLR2/TLR6 (Akira et al., 2006; Ji-Hyun et al., 2015).

5.7.4 Polisacharydy

Polisacharydy stanowią najlepiej poznaną grupę antygenów powierzchniowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Wyróżnia się dwie zasadnicze grupy: zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS), które wydzielane są do środowiska lub luźno związane z powierzchnią ściany komórkowej, i polisacharydy ściany komórkowej (CWP), które są kowalencyjnie zakotwiczone w peptydoglikanie (Deng et al., 2000). Ponadto pod względem chemicznym mogą one należeć do homo- (zbudowane z jednego rodzaju monosacharydu) lub hetero-polisacharydów (zbudowane z kilku rodzajów monosacharydów). Heteropolisacharydy (należące do EPS jak i CWP) *Bifidobacterium* składają się najczęściej z trzech podstawowych podjednostek cukrowych: D-glukozy, D-galaktozy i L-ramnozy (Salazar et al., 2009). Do rzadziej występujących cukrów w strukturach polisacharydowych należą 6-deoksy-L-taloza, kwas galakturonowy (Altmann et al., 2016), D-mannoza i L-arabinoza (Shang et al., 2013). Masy cząsteczkowe polisacharydów wahają się w zakresie 10⁴-10⁶ Da, a ich skład różni się między poszczególnymi szczepami (Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilán, 2005). Polisacharydy chronią bakterie przed rozpoznaniem przez komórki układu odpornościowego, a tym samym umożliwiają wytworzenie tolerancji na *Bifidobacterium*. Pośredniczą one również, podobnie jak LTA w procesie przylegania bakterii do komórek nabłonka (Fanning et al., 2012). Badania nad EPS i CWP wskazują, że struktura chemiczna i ilości w jakich są produkowane są uzależnione od warunków środowiska w jakich rosną bakterie. Gwarantuje to bakteriom znacznie większe prawdopodobieństwo przetrwania w zróżnicowanym pod względem warunków układzie pokarmowym (Kelly et al., 2020). Najlepszym sposobem na rozpoznanie szczepów produkujących EPS jest hodowla bakterii na płycie MRSC-agar, na której można zaobserwować gładki i błyszczący wygląd kolonii oraz fakt, że podczas posiewu śluz ciągnie się za eżą bakteriologiczną (De Vuyst and Degeest, 1999; Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilán, 2005). Zaobserwowano, że *B. longum* ATCC 15707 produkuje znacznie większe ilości EPS, gdy bakterie były hodowane w pożywce zawierającej pepton/ekstrakt drożdżowy o pH=5,0, niż gdy były hodowane w pożywce zawierającej odłuszczone mleko.

Ponadto doszło również do zmiany proporcji cukrów tworzących łańcuch EPS w zależności od rodzaju dostępnego źródła węgla w środowisku (Abbad Andaloussi et al., 1995). Tworzenie ochronnej polisacharydowej otoczki na zewnątrz komórki pozwala bakteriom na przeżycie w niskim/wysokim pH, niskim/wysokim stężeniu soli czy w obecności enzymów trawiennych (Kelly et al., 2020). Badania z wykorzystaniem mutantów bakteryjnych nie produkujących polisacharydów i porównanie ich z dzikimi szczepami wskazują, że obecność wysoko cząsteczkowych łańcuchów może uniemożliwiać wiązanie się bakterii do komórek gospodarza (Lee et al., 2016). Badania z wykorzystaniem *B. longum* 105-A i jego mutantem nie produkującym CWP wykazały, że dziki szczep charakteryzuje się wyższą tolerancją na zmiany pH i obecność soli żółciowych, podczas gdy mutant nie był w stanie przeżyć w pH 6,5–3,5. Ponadto zaobserwowano zmiany w przyleganiu bakterii do komórek nabłonka CaCo-2 i makrofagów RAW 264.7. Co ciekawe, dziki szczep nie wiązał się do komórek ani nie był przez nie wchłaniany, mutant bez CWP z kolei wiązał się z CaCo-2 i uległ fagocytozie (Ashida et al., 2018).

Podstawowymi technikami wykorzystywanymi do określenia struktur polisacharydów są spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometria mas oraz metody chemiczne takie jak analiza cukrowa, analiza metylacyjna i analiza konfiguracji absolutnej z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas (Fontana and Widmalm, 2022). Polisacharydy są dotychczas najszerzej opisaną pod względem badań strukturalnych grupą antygenów powierzchniowych *Bifidobacterium* (Pyclik et al., 2020). Jednym z najbardziej prostych polisacharydów opisanych w literaturze jest polisacharyd *B. longum* YIT4028, który składa się z reszt D-galaktozy i L-ramnozy w stosunku 2:3 (Nagaoka et al., 1995) (**Tabela 3**). Z kolei innym ciekawym przykładem są dwa polisacharydy *B. longum* ssp. *infantis* ATCC15697 – nierozgałęziony, którego powtarzająca się podjednostka składa się z ośmiu monosacharydów, którymi są D-galaktoza i D-glukoza w stosunku molowy 3:1 i rozgałęziony z głównym łańcuchem zbudowanym przede wszystkim z galaktofuranozy i galaktopiranozy, które podstawione są β -D-glukopiranozą (Sela et al., 2008) (**Tabela 3**). Przykładem polisacharydu, który w łańcuchu głównym zawiera sześć reszt 6-deoksytalozy jest ten zidentyfikowany w *B. adolescentis* YIT4011 (Nagaoka et al., 1988) (**Tabela 3**).

Tabela 3 Przykładowe struktury polisacharydów zidentyfikowanych na powierzchni ściany komórkowej szczepów *Bifidobacterium*

SZCZEP	STRUKTURA	ODNOŚNIK
<i>B. longum</i> YIT4028		(Nagaoka et al., 1995)
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> ATCC15697		(Sela et al., 2008)
<i>B. adolescentis</i> YIT4011		(Nagaoka et al., 1988)

Polisacharydy szczepów *Bifidobacterium* oprócz ochrony przed działaniem środowiska wpływają również na regulację ilości innych bakterii. EPS wyizolowany z *B. pseudocatenulatum* wpływa na wzrost *Desulfovibrio* i *Feacalibacterium*. Z kolei EPS z *B. longum* wspomaga wzrost *Anaerostipes*, *Provetella* i *Oscillospira* (Salazar et al., 2008). Ruas-Madiedo i współp. wykazali, że wysokie stężenia (5 mg/ml) EPS wyizolowanych ze szczepów *B. longum* NB667 i *B. animalis* IPLA-R1 może modulować wzrost bakterii *B. animalis* IPLA-R1 i *Lactobacillus* GG. Ponadto EPS-NB667 zwiększa zdolność patogennych szczepów *Clostridioides difficile*, *Enterobacter sakazakii* i *E. coli* do wiązania się z ludzkimi komórkami nabłonka jelitowego. W przypadku obecności w pożywce hodowlanej EPS-GG i EPS-IPLA-R1 zaobserwowano wzrost zdolności przylegania szczepów *Enterobacter sakazakii* i *E. coli* (Ruas-Madiedo et al., 2006). Lopez i współp. wykazali, że w zależności od budowy, EPS był w stanie zmienić stopień adhezji

szczepów *Bifidobacterium* do linii komórek jelitowych i indukcję cytokin (López et al., 2012). Polisacharyd składający się w 60% z podjednostek ramnozowych chronił komórki nabłonkowe żołądka w modelu owrzodzenia wywołanego kwasem octowym (Nagaoka et al., 1994). Badania porównawcze właściwości modulujących *B. animalis* ssp. *lactis* DSM10140 i jego mutantu S89L, do którego wklonowano geny odpowiadające za produkcję EPS z *B. animalis* ssp. *lactis* IPLA-R1, wykazały, że mutant ma mniejsze zdolności przylegania do komórek nabłonka jelitowego HT-29. Ponadto nie tworzy tak rozbudowanych struktur biofilmu w porównaniu do szczepu produkującego EPS-DSM10140. Wskazuje to, że EPS o neutralnym ładunku i dużej masie cząsteczkowej jest w stanie zahamować indukcję cytokin prozapalnych, podczas gdy EPS o niewielkiej masie cząsteczkowej lub posiadający reszty kwasowe najczęściej stymuluje układ odpornościowy (Abdalla et al., 2021). Zaobserwowano również, że ujemnie naładowany łańcuch polisacharydowy stymuluje układ odpornościowy do indukcji odpowiedzi przeciw bakteriom Gram-dodatnim znacznie lepiej niż Gram-ujemnym (Nehal et al., 2019).

EPS badane są również pod względem ich właściwości bakteriostatycznych. Ruas-Madiedo i współp. wykazali, że EPS izolowane z *B. animalis* ssp. *lactis* A1, *B. animalis* ssp. *lactis* IPLA R1, *B. longum* NB667 i *L. rhamnosus* GG hamują toksyczość *Bacillus cereus* względem komórek nabłonkowych Caco-2 (Ruas-Madiedo et al., 2010). Badania nad *B. longum* ssp. *infantis* 35624 produkującym heteropolisacharyd pokazały, że jego podawanie chroni przed utratą wagi, obniża poziom cytokin prozapalnych i zmniejsza uszkodzenie nabłonka wywołane przez *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* UK1 (Altmann et al., 2016; Symonds et al., 2012). Porównanie właściwości immunomodulujących dwóch izogenicznych szczepów *B. animalis* ssp. *lactis* wykazało, że szczep S89L produkujący wysokocząsteczkowy EPS zawierający dużą ilość podjednostek ramnozowych indukuje znaczący wzrost bakterii z rodzaju *Faecalibaculum*, *Erysipelotrichaceae* i *Lactobacillaceae* oraz pośrednio stymuluje wzrost poziomu IL-5 i IL-27 (Sabater et al., 2020).

Polisacharydy *Bifidobacterium* rozpoznawane są głównie przez receptory TLR2 (Lebeer et al., 2010; Schiavi et al., 2016). Cząsteczki β -glukanu/galaktanu zidentyfikowane w *B. bifidum* są odpowiedzialne za indukcję limfocytów Foxp3^+ T_{reg} poprzez aktywację receptora TLR2 (Verma et al., 2018a). Podobnie dzieje się w przypadku EPS z *B. longum* ssp. *longum* 3562, który by hamować produkcję osteoklastów czy zapobiegać spodkowi ubytku kości w mysich modelach osteoporozy pomenstruacyjnej, wymaga obecności receptora TLR2 (Wallimann et al., 2021). Ponadto w kilku pracach opisano, że polisacharydy mogą wiązać się z receptorami lektynowymi typu C takimi jak dektyna-1, dektyna-2 czy receptorami mannozy (Hollmig et al., 2009; Sengupta et al., 2013). Niektóre badania również wskazują na aktywację receptora TLR4 (Castro-Bravo et al., 2019; Zhang et al., 2016a). Badania nad EPS ze szczepów *B. breve* wykazały, że aktywacja odpowiedzi immunologicznej w komórkach monocytów THP-1 zależna jest od obecności białka MyD88, głównego adaptera w szlaku aktywacji odpowiedzi immunologicznej zależnej od receptorów TLR

(Hickey et al., 2021). Stymulacja komórek BMDM dwoma szczepami *B. breve* UCC2003 i JCM7017 oraz ich mutantami nie produkującymi EPS, prowadziła do znaczących różnic w odpowiedzi cytokinowej. W przypadku szczepu UCC2003, mutant UCC2003^{EPSneg} indukował znacznie wyższy poziom TNF- α oraz IL-10 w porównaniu do dzikiego szczepu. Z kolei w przypadku szczepu JCM7017, mutant JCM7017^{EPSneg} indukował znacznie niższy poziom zarówno TNF- α jak i IL-10 w porównaniu do dzikiego szczepu. Oba szczepy produkujące EPS nie aktywowały limfocytów T CD4⁺ oraz dojrzewania komórek dendrytycznych (Hickey et al., 2021).

Wyniki badań nad polisacharydem wyizolowanym z *B. lactis* A1dOxR wskazują, że odpowiada on za właściwości immunomodulacyjne tego szczepu. Uzyskane stosunki poziomów cytokin TNF- α /IL-10 i TNF- α /TGF- β wytwarzanych przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) stymulowane bakteriami i wyizolowanym z nich EPS były identyczne dla obu grup (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014). Po podaniu myszom EPS uzyskanego z *B. breve* UCC2003 dochodzi do zmian w populacji komórek limfocytów B, jak również spadku poziomu przeciwciał IgG i wydzielniczych IgA (Fanning et al., 2012). Interesująca była obserwacja, w której bakterie z delecją genów odpowiedzialnych za produkcję EPS straciły całkowicie swoje właściwości modulujące w modelu IBD indukowanym LPS (Hughes et al., 2017). Schiavi i współp. wskazali, że EPS *B. longum* 35624 jest cząsteczką determinującą właściwości przeciwzapalne tego szczepu poprzez modulowanie ścieżki limfocytów Th17 w badaniach nad zapaleniem okrężnicy i alergii wziewnej u myszy (Schiavi et al., 2016). EPS z *B. animalis* RH stymuluje proliferację komórek kępek Peyera oraz moduluje poziom IFN- γ co wpływa na równowagę między limfocytami Th1/Th2 u myszy Kunming (Xu et al., 2017).

5.7.5 Białka ściany komórkowej

5.7.5.1 Serpiny

Serpiny obecne są we wszystkich organizmach żywych, a ich główną funkcją jest hamowanie aktywności proteaz serynowych. Niektóre białka z tej grupy pełnią również inne zadania takie jak regulacja ciśnienia krwi, czy pośredniczą w transportowaniu hormonów (Mkaouar et al., 2019). W przypadku szczepów *Bifidobacterium* najprawdopodobniej umożliwiają łatwiejsze zasiedlenia układu pokarmowego inaktywując proteazy produkowane przez komórki gospodarza lub innych bakterii (Ivanov et al., 2006). Serpiny wiążąc się z proteazą zmieniają jej konformację przestrzenną co prowadzi do nieodwracalnej dezaktywacji białka (Loebermann et al., 1984). Taki mechanizm działania zaobserwowano dla serpin z *B. longum* NCC27 działających na elastazę trzustkową oraz neutrofilową. Z kolei serpina z *B. longum* hamuje nadmierną aktywność proteaz serynowych w miejscach zapalenia jelit, co znacząco ogranicza nadmierne uszkodzenie nabłonka (Ivanov et al., 2006). W przypadku *B. longum* NCC2705 wykazano, że to obecność serpin indukuje zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego oraz znacznie zmniejsza stan zapalny jelit w mysim modelu

nietolerancji na gluten wywołanej podawaniem toksyny cholery i gliadyny (McCarville et al., 2017). Inne badania z wykorzystaniem mysiego modelu IBS wykazały, że spośród 33 szczepów *Bifidobacterium* to szczep *B. breve* CNCM I-5644 produkujący serpiny miał największy wpływ na ochronę komórek nabłonka jelitowego po podaniu kwasu nitrobenzenosulfonowy indukującego stan zapalny (Torres-Maravilla et al., 2022).

5.7.5.2 Struktury przypominające pilusy

Pilusy są charakterystycznymi długimi zewnątrzkomórkowymi strukturami biorącymi udział w oddziaływaniach między komórkami nabłonka gospodarza, a bakteriami lub między dwoma komórkami bakteryjnymi (Faroni et al., 2011; Turroni et al., 2017). Białka te zbudowane są zazwyczaj z podjednostek przypominających strukturalnie włos. Specyficzne adhezyny znajdujące się na powierzchni pilusów biorą udział w procesie przylegania bakterii do komórek poprzez wiązanie się do kwasów lipoteichojowych czy receptorów glikoproteinowych lub glikolipidowych (Ventura et al., 2012). Na powierzchni *Bifidobacterium* zidentyfikowano dwa rodzaje pilusów: zależne od sortazy i Tad-pilusy (Faroni et al., 2011; O'Connell Motherway et al., 2011).

5.7.5.3 Pilusy zależne od sortazy

Obecnie tylko w niektórych gatunkach *Bifidobacterium* zidentyfikowano pilusy zależne od sortazy, enzymu proteolitycznego biorącego udział w budowie struktur zewnątrzkomórkowych. Bakterie u których zidentyfikowano te struktury to: *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. adolescentis* i *B. animalis* ssp., czy *B. minimum*, *B. choerinum*, *B. pseudolongum* ssp. i *B. kashiwanohense*. Zaobserwowano, że u *B. pseudolongum* ssp. GLOB10b pilusy występują tylko w obecności skrobi w pożywce hodowlanej (Milani et al., 2017c). Pilusy u bifidobakterii składają się z trzech podjednostek białkowych, z których jedna jest głównym rusztowaniem, a dwie służą jako wsparcie (Proft and Baker, 2008; Telford et al., 2006). U *B. bifidum* PRL2010 są one zbudowane z pilusu głównego występującego w dwóch formach FimA i FimP oraz pomocniczego FimB i/lub FimQ (Faroni et al., 2011; Krishnan et al., 2016). W zależności od szczepu rozłożenie pilusów jak i ich ilości jest zmienna. U *B. bifidum* PRL2010 zaobserwowano dużą liczbę pilusów na wertykalnych końcach komórki. Z kolei *B. longum* ssp. *infantis* ATCC15696 ma tylko niewielką ilość pilusów na powierzchni komórki (Faroni et al., 2011). Aktywacja genów odpowiedzialnych za ich produkcję zależy od warunków środowiska tj. źródła węgla w pożywce, pH, temperatury czy stresu osmotycznego (Faroni et al., 2011).

Mechanizm wiązania *Bifidobacterium* do komórek gospodarza za pomocą pilusów stworzono w oparciu o badania nad *B. bifidum* PRL2010. Model ten zakłada, że pilusy są wydłużane przez bakterie do momentu gdy natknie się ona na antygeny powierzchniowe innych komórek. Główny pilus FimA wiąże się z typowymi powierzchniowymi glikanami, takimi jak fukoza i mannoza, a FimP z węglowodanami obecnymi w diecie (Turroni et al., 2013). Badania

przeprowadzone na dzikim szczepie *B.bifidum* YIT 10347 oraz jego mutancie, którego geny budujące pilusy zależne od sortazy zostały uszkodzone w wyniku mutagenyzy, wykazały że szczep dziki znacznie lepiej wiąże się z powierzchnią komórek nabłonka i chroni je przed działaniem kwasów (Ishikawa et al., 2021). Do tej pory ukazała się tylko jedna praca, w której wykazano, że pilusy mogą pełnić rolę immunomodulującą i indukować *in vitro* ekspresję genów kodujących TNF- α w linii ludzkich makrofagach U937. Wyniki *in vivo* na zdrowych myszach Balb/c również potwierdzają, że bakterie zawierające pili indukują produkcję TNF- α , a ponadto hamują ekspresję genu *il10* (Turroni et al., 2013).

5.7.5.4 Tad-pilusy

Tad-pilusy lub pilusy typu IV są innym rodzajem struktur na powierzchni *Bifidobacterium*, które po raz pierwszy scharakteryzowano u *B. breve* UCC2003 (O'Connell Motherway et al., 2011). Tad-pilusy są zbudowane z powtarzalnych podjednostek homopolimerowych, które połączone są ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi. Tworzą one charakterystyczne spirale dzięki oddziaływaniom bocznych grup aminokwasowych naładowanych ujemnie bądź dodatnio. Geny kodujące Tad-pilusy są konserwatywne i łatwo je zidentyfikować u wielu przedstawicieli bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Ich podstawową funkcją jest wiązanie się z glikoproteinami i glikolipidami znajdującymi się na powierzchni komórek nabłonka jelit. Do tej pory nie opisano żadnych właściwości immunomodulacyjnych tych struktur (Tomich et al., 2007), jednak wykazano że są one niezbędne w procesie kolonizacji układu pokarmowego oraz promują proliferację komórek nabłonkowych (O'Connell Motherway et al., 2019).

5.7.5.5 Bakteryjne systemy sekrecyjne typu IV (T4SS)

Jednym ze składowych elementów T4SS jest białko TgaA, które zostało scharakteryzowane u *Bifidobacterium* jako enzym peptydoglikanolityczny, który składa się z dwóch konserwatywnych podjednostek litycznych: transglikozyazy mureinowej (LT, cd00254.3) oraz amidohyrolazy /peptydazy zależnej od cysteiny i histydyny (CHAP; pfam05257.4). Guglielmetti i współp. wykazali, że białko to jest ekspresjonowane na powierzchni *B. bifidum* MIMBb75 i posiada właściwości immunomodulujące. Białko to zdolne jest do aktywacji komórek dendrytycznych, które produkowały IL-2 i TNF- α . Co ciekawe, indukcję TNF- α przez komórki dendrytyczne przypisuje się obecności LPS i aktywacji receptora TLR4. Dalsze badania jednak wykluczyły tę możliwość, a ponadto wykazały, że białko TgaA nie jest rozpoznawane przez ten receptor (Guglielmetti et al., 2014).

5.7.5.6 Pozostałe białka powierzchniowe

Do innych białek, które mogą potencjalnie wykazywać właściwości immunomodulujące należą fosfoketolaza fruktozo-6-fosforanowa czy enolaza fosforanowa. Oba białka zostały

zidentyfikowane w szczepach *B. longum* ssp. *longum* CCM 7952 i CCDM 372. W badaniach nad określeniem ich immunoreaktywności z wykorzystaniem surowic: krwi obwodowej uzyskanej z królika immunizowanego tymi szczepami, człowieka oraz myszy GF monokolonizowanej szczepem CCDM 372. Zidentyfikowane zostały również inne immunoreaktywne białka określane mianem „moonlight proteins” takie jak kinazy asparaginiowe i pirogronianowe, transporter ABC, czy dehydrogenaza 3-fosforanu aldehydu glicerynowego. Białka te charakteryzują się pełnieniem więcej niż jednej funkcji w komórce (Górska et al., 2016). Lipoproteina bopA wyizolowana z *B. bifidum* MIMBb75 jest odpowiedzialna za wiązanie się bakterii do komórek nabłonkowych, indukując również produkcję IL-6 i IL-8 oraz umożliwia adhezję bakterii do komórek nabłonkowych CaCo-2 (Gleinser et al., 2012; Guglielmetti et al., 2008). Co ciekawe wyniki innej grupy częściowo zaprzeczają by białko to brało udział w procesie przylegania bakterii do komórek, wskazując, że wykorzystanie przeciwciał anti-bopA nie wpływa na wiązanie się bakterii do komórek nabłonka CaCo-2 i HT-29 (Kainulainen et al., 2013). Za pomocą narzędzi bioinformatycznych zidentyfikowano również sekwencję aminokwasową podjednostki translokazy SecA w *B. longum* DJ10A (Uniprot ID: B3DR89), która indukowała w komórkach krwi obwodowej produkcję IL-6, IL-12p70 oraz IL-23 i tym samym, jak wskazują naukowcy, może wpływać na równowagę Th17/Th22. Samo białko znajduje się na powierzchni błony komórkowej, gdzie uczestniczy w przemieszczaniu się polipeptydów z wykorzystaniem ATP (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017).

6 CEL PRACY

Głównym celem pracy było określenie właściwości immunomodulujących szczepu *Bifidobacterium longum* spp. *longum* CCDM 7952 w terapii schorzeń o podłożu alergicznym.

Cel realizowany był poprzez trzy cele cząstkowe:

1. Określenie *in vitro* profilu cytokinowego jaki indukują wybrane szczepy *Bifidobacterium* z wykorzystaniem szeregu linii komórek immunologicznych i nabłonkowych oraz splenocytów uzyskanych od myszy uwrażliwionych na OVA. Równocześnie określenie wpływu termicznej inaktywacji bakterii na właściwości immunomodulujące oraz fizykochemiczne badanych szczepów bakteryjnych.
2. Określenie możliwości wykorzystania wybranego szczepu *Bifidobacterium* w leczeniu alergii wziewnej z wykorzystaniem mysiego modelu alergii wziewnej indukowanej OVA z uwzględnieniem wpływu termicznej inaktywacji bakterii.
3. Określenie właściwości immunomodulujących antygenów powierzchniowych wybranego szczepu *Bifidobacterium*, które mogą być odpowiedzialne za obserwowane właściwości biologiczne.

7 MATERIAŁY I METODY

7.1 SZCZEPY BAKTERYJNE I WARUNKI HODOWLI

Osiem szczepów *Bifidobacterium* otrzymano z Czeskiej Kolekcji Mikroorganizmów Mleczarskich (Laktoflora, Milcom, Tabor, Czechy): *B. longum* ssp. *longum* CCDM 372 i CCM 7952; *B. longum* ssp. *infantis* CCDM 369; *B. animalis* CCDM 218 i CCDM 366; *B. adolescentis* CCDM 368, CCDM 370 oraz CCDM 373 (**Tabela 4**). Zostały one wyizolowane z kału zdrowych ludzi bądź noworodków karmionych mlekiem matki. Szczepy hodowano w płynnym podłożu MRS (Oxoid, Hampshire, UK) z dodatkiem 0,05% chlorowodoru L-cysteiny (MRSC, Merck Millipore, Massachusetts, USA) w temperaturze 37 °C, w warunkach beztlenowych (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) z wykorzystaniem tzw. systemu Gas-Pak (BD GasPak EZ, USA) przez 48-72 godziny (Leuschner et al., 2003) w inkubatorze (Heraeus Series 6000, VWR, USA). Hodowle bakteryjne odwirowano (7000 rpm, 15 min, 4 °C, Hermle Centrifuge Z 36MK, Labnet International), a osad bakteryjny przemyto dwukrotnie sterylnym buforem fosforanowym (PBS, IITD PAN, PL). Liczbę komórek bakterii określano po 48-godzinnej hodowli w warunkach beztlenowych, poprzez policzenie powstałych kolonii na podłożu stałym MRSC wzbogaconym agarem (Oxoid, Hampshire, UK) (Daniela et al., 2011). Dodatkowo, liczba komórek bakterii została określona z wykorzystaniem QuantomTx Microbial Cell Counter (Logos Biosystems, Korea Południowa). Uzyskane stężenia bakterii zostały następnie przypisane do wartości gęstości optycznej (OD) mierzonej przy $\lambda = 600$ nm.

Tabela 4 Szczepy *Bifidobacterium* uzyskane z Czeskiej Kolekcji Mikroorganizmów Mleczarskich. Bakterie hodowano w warunkach beztlenowych (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) w pożywce MRSC w temperaturze 37 °C przez 48 -72 godziny.

NAZWA SYSTEMOWA SZCZEPU	SKRÓT WYKORZYSTANY W PRACY
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> CCDM 372	Bl 372
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> CCM 7952	Bl 7952
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> CCDM 369	Bin 369
<i>B. animalis</i> CCDM 218	Ban 218
<i>B. animalis</i> CCDM 366	Ban 366
<i>B. adolescentis</i> CCDM 368	Bad 368
<i>B. adolescentis</i> CCDM 370	Bad 370
<i>B. adolescentis</i> CCDM 373	Bad 373

7.2 INAKTYWACJA TERMICZNA BIFIDOBAKTERII

Bakterie hodowano w warunkach opisanych w punkcie 7.1, odwirowano (7000 rpm, 15 min, 4 °C, Hermle Centrifuge Z 36MK, Hermle Labortechnik, DE), a po dwukrotnym przemyciu sterylnym PBS, pozostawiono je w 4 °C. Inaktywację prowadzono przez godzinę w łaźni wodnej (W115E, Laboplay, PL) w temperaturze 65 °C (Simpson et al., 2005). Po ostudzeniu do temperatury pokojowej, próbki przechowywano w temperaturze 4 °C. Skuteczność inaktywacji została sprawdzona poprzez 48-godziną hodowlę bakterii na podłożu płynnym MRSC, a następnie wysianie ich na podłoże stałe MRSC-agar.

7.3 SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA NISKONAPIĘCIOWA

Badania z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej umożliwiają zobrazowanie warstwa po warstwie fragmentów powierzchni bakterii, co prowadzi do powstania dwuwymiarowego obrazu, który pozwala zaobserwować delikatne zewnątrzkomórkowe struktury nie uszkadzając komórek (Pollard et al., 2017).

Żywe bakterie zostały pobrane z podłoża stałego MRSC-agar (patrz rozdział 7.1) przy użyciu silikonowego chipa o wymiarach 7 x 7 mm. Bakterie inaktywowane termicznie zawieszono w 1 ml PBS i umieszczono w probówce typu Eppendorf, w której zanurzono chip. W obu przypadkach, chip pozostawiono na 2 min, aby umożliwić bakteriom przyklejenie się do jego silikonowej powierzchni. Następnie chipy przepłukano PBS o temperaturze pokojowej, zanurzono w roztworze 2,5% aldehydu glutarowego (Sigma Aldrich, USA) w 0,1M buforze kakordylowym pH 7,2 (Sigma Aldrich, USA) i pozostawiono na 30 min. Po tym czasie chipy przepłukano 5-krotnie 0,1 M buforem kakordylowym, za każdym razem prowadząc 30 min inkubację w 4 °C. Proces odwodnienia prowadzono poprzez serię godzinnych inkubacji w lodowym metanolu (POCH, PL) o następujących stężeniach 25, 40, 60, 80 i 100%. Chipy przemyto 100% metanolem i wysuszono z użyciem ciekłego CO₂ w suszarce Leica CPD300 AUTO (Leica Microsystems, DE). Następnie bakterie na chipie zostały zobrazowane w skaningowym mikroskopie elektronowym niskonapięciowym (LV-SEM, Auriga 60, Carl Zeiss, DE) przy napięciu przyspieszającym 1,2 kV (Al-Wrafiy et al., 2019).

7.4 POMIARY WIELKOŚCI I ŁADUNKU SZCZEPÓW *BIFIDOBACTERIUM*

Żywe i termicznie inaktywowane szczepy *Bifidobacterium* przygotowano w stężeniu 10⁷ CFU/ml w objętości 300 µl PBS (opis hodowli i inaktywacji w rozdziałach 7.1 i 7.2). Próbkę umieszczono w kuwecie pomiarowej (Folded Capillary Cell, DTS1070, Malvern Panalytical, UK), a następnie określono rozmiar komórki poprzez pomiar dynamicznego rozpraszania światła (Dynamic Light Scattering, DLS) oraz potencjał zeta poprzez elektroforetyczne pochłanianie

światła (Electrophoretic Light Scattering, ELS) z wykorzystaniem Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK). Pomiar DLS umożliwił określenie wielkości cząsteczki poprzez pomiar rozproszenia wiązki lasera padającego na tą cząsteczkę. Ponadto mierzy rozrzut wielkości pomiędzy badanymi cząsteczkami (Berne and Pecora, 2000). ELS umożliwił pomiar ładunku powierzchniowego cząsteczek poprzez działanie pola elektrycznego na komórki bakterii. Badanie prędkości ruchu komórek w polu elektrycznym określa się jako ruchliwość elektroforetyczną i przelicza na jednostki potencjału zeta (Ware and Flygare, 1972). Pomiar wykonano rozcieńczając próbkę do objętości 1,5 ml w wodzie ultraczystej. Każda próbka została zmierzona pięciokrotnie w temperaturze 25 °C przy napięciu regulowanym automatycznie przez oprogramowanie Zetasizer Nano software v3.30 (Malvern Panalytical, UK). Przyjęto współczynnik dyspersji RI równy 1,333 oraz lepkość (Cp) równą 0,87.

7.5 WARUNKI HODOWLI UNIEŚMIERTELNIANYCH LINII KOMÓRKOWYCH

W **Tabeli 5** umieszczono spis linii komórkowych wykorzystanych w badaniach wraz z informacjami o ich pochodzeniu i użytej pożywce hodowlanej.

Tabela 5 Linie komórkowe wykorzystane do oceny właściwości immunomodulujących żywych i termicznie inaktywowanych szczepów Bifidobacterium

LINIA KOMÓRKOWA	CHARAKTERYSTYKA LINII	POŻYWKA HODOWLANA
RAW 264.7 (ATCC TIB-71)	Linia adherentnych makrofagów wyizolowana z mysiego guza indukowanego wirusem białaczki Ablesona	RPMI 1640 (Gibco, USA) 10% FBS (ThermoFisher Scientific, USA) 100 U/ml penicylina, 100 µg/ml streptomycyna i 2 mM L-glutamina (1% PenStrepGlu, ThermoFisher Scientific, USA)
JAWS II (ATCC CRL-11904)	Linia adherentnych i nie adherentnych komórek dendrytycznych wyizolowanych ze szpiku kostnego myszy	MEM- alpha (Gibco, USA) 10% FBS 1% PenStrepGlu
TC-1 (ATCC CRL-2785)	Linia mysich adherentnych komórek nabłonka płucnego, a następnie unieśmiertelniona wirusem brodawczaka ludzkiego 16 (HPV-16) E6/E7 i ko-transformowana przy wykorzystaniu ludzkiego genu c-Ha-Ras	DMEM (Gibco, USA) 10% FBS 1% PenStrepGlu
iBMDM (Siednienko et al., 2010)	Linia mysich adherentnych makrofagów wyizolowana z makrofagów pochodzących ze szpiku kostnego, a następnie unieśmiertelniona przy pomocy	DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu

	rekombinowanego retrowirusa J2	
MH-S (CRL-2019)	Linia mysich adherentnych i nie adherentnych makrofagów pęcherzykowych wyizolowanych z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych myszy Balb/c i transformowanych przy pomocy małpiego wirusa 40	RPMI 1640 10% FBS 1% PenStrepGlu 0,05 mM β -merkaptotoetanol (Sigma Aldrich, USA)
RBL-2H2 (CRL-2256, ATCC)	Linia adherentnych szczurzych pochodzących z krwi obwodowej	EMEM (Gibco, USA) 15 % FBS 1% PenStrepGlu
HEK293-hTLR2 (293-htlr2, InvitroGen)	Linia ludzkich komórek embrionalnych nerki HEK293, do których stabilnie wprowadzono geny kodujące ludzkie receptory TLR2 wraz z genami reporterowymi IL-8 i NF- κ B	Pasaż 1 - 3 po wysianiu: DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu 100 μ g/ml normocyny (InvitroGen, USA) Pasaż 4 i wyższe: DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu 100 μ g/ml normocyny 10 μ g/ml blastycydyny (InvitroGen, USA)
HEK293-hTLR4 (293-htlr4a, InvitroGen)	Linia ludzkich komórek embrionalnych nerki HEK293 do których stabilnie wprowadzono geny kodujące ludzkie receptory TLR4 wraz z genami reporterowymi IL-8 i NF- κ B	Pasaż 1 - 3 po wysianiu: DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu 100 μ g/ml normocyny Pasaż 4 i wyższe: DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu 100 μ g/ml normocyny 10 μ g/ml blastycydyny
HEK293-hNOD2 (293-hnod2, InvitroGen)	Linia ludzkich komórek embrionalnych nerki HEK293 do których stabilnie wprowadzono geny kodujące ludzkie receptory NOD2 wraz z genami reporterowymi IL-8 i NF- κ B	Pasaż 1 - 3 po wysianiu: DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu 100 μ g/ml normocyny Pasaż 4 i wyższe: DMEM 10% FBS 1% PenStrepGlu 100 μ g/ml normocyny 10 μ g/ml blastycydyny

Linie komórkowe hodowano w inkubatorze w temperaturze 37 °C, w obecności 5% CO₂ (Inkubator CO₂ Binder BF170, Binder, Sigma Aldrich, USA). Pożywkę hodowlaną wymieniano co dwa lub trzy dni. Komórki pasażowano, gdy 70-80 % powierzchni naczynia hodowlanego było zajęte przez komórki (konfluencja). W pierwszej kolejności usuwano starą pożywkę, a następnie

do naczynia dodawano roztwór 0,25% trypsyny - EDTA o pH 7,2. Naczynie z komórkami umieszczano z powrotem w inkubatorze na 2-10 min w zależności od linii. Roztwór trypsyny i EDTA trawi białka znajdujące się na powierzchni komórki przez co dochodzi do oderwania się komórek od ścian naczynia. Zawiesinę komórek przenoszono do sterylnego falkonu z pożywką i wirowano przy 1200 rpm, przez 5 min. Osad komórkowy (pelet) rozpuszczano w świeżej pożywce do uzyskania pożądanej gęstości i ponownie umieszczano w naczyniu hodowlanym. W przypadku kultur nie adherentnych komórki zbierano wraz z pożywką do próbówki typu falkon, zwirowano i ponownie wysiewano w świeżej pożywce przy odpowiedniej gęstości komórek.

Linie ludzkich komórek embrionalnych nerki HEK293, do których stabilnie wprowadzono geny kodujące ludzkie receptory TLR2, TLR4 i NOD2 (InvivoGen, USA), hodowano zgodnie z zaleceniami producenta. Po rozmrożeniu komórki umieszczono w pożywce DMEM wzbogaconej glukozą z dodatkiem 10% FBS, 1% PenStrepGlu i 100 µg/ml normocyny (InvitroGen, USA). Po osiągnięciu przez komórki 70-80% konfluencji pożywkę usunięto, a komórki inkubowano w ciepłym sterylnym PBSie przez 2-3 min w 37 °C. Tak uzyskaną zawiesinę komórek wirowano przy 1200 rpm przez 5 min. Po 3 pasażu do pożywki hodowlanej dodano 10 µg/ml blastycydyny (InvivoGen, USA). Badania przeprowadzone na tych liniach zostały wykonane pomiędzy trzecim, a dwudziestym pasażem zgodnie z instrukcją producenta.

Komórki zliczano poprzez przygotowanie mieszaniny komórek z 0,4 % błękitem trypanu (Sigma Aldrich, USA) w stosunku 1:1 (v/v) i naniesieniu w objętości 10 µl na slajd. Ich liczbę określono przy wykorzystaniu licznika komórek TC20 (TC20 Automated Cell Counter, BioRad, USA). Uzyskane wartości przedstawiały liczbę komórek na ml oraz ich przeżywalność.

7.5.1 Badanie właściwości immunomodulujących bifidobakterii w warunkach *in vitro* wykorzystując linie nieśmiertelne

Komórki linii opisanych w punkcie 7.5 w ilości $0,5 \times 10^6$ zawieszono w 150 µl pożywki hodowlanej, a następnie naniesiono na dołek 96-dołkowej płytki (Nunc MaxiSorp, Sigma Aldrich) i pozostawiono na 4-6 godzin w inkubatorze (37 °C, 5% CO₂). Inkubacja ta umożliwia komórkom przyklejenie się do powierzchni płytki. W przypadku linii nie adherentnych, komórki pozostawiano na płytce przez 1 godzinę. Następnie do dołków dodawano 50 µl preparatów zawierających żywe bądź inaktywowane termicznie bakterie zawieszono w PBSie w ilości $0,5 \times 10^7$ CFU/dołek. W przypadku stymulacji antygenami, dodawano je w końcowym stężeniu równym 10 µg/ml dla LTA lub peptydoglikanu i 30 µg/ml dla polisacharydów. Stymulację prowadzono przez 18 godzin, a następnie płytki wirowano przy 1200 rpm przez 5 min. Płyn z nad hodowli umieszczono w -40 °C do momentu wykonania testów immunoenzymatycznych typu ELISA (Invitrogen, Thermo Fisher). Uzyskane próbki przebadano na obecność cytokin szlaku Th1/Th2/T_{reg} (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, MCP-1, GM-CSF, interferon typu I, TNF-α i TGF-β)

postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Eksperymenty zostały wykonane w conajmniej trzech powtórzeniach.

Komórki linii HEK293 odklejano poprzez potraktowanie je 2-3 ml ciepłego PBSu przez 5 min. Komórek nie wirowano ponieważ zgodnie z zaleceniami producenta ulegają wtedy adhezji tworząc trudne do rozdzielenia agregaty. Komórki w stężeniu 5×10^4 komórek/dołek naniesiono na 96-dołkowe płytki w objętości 180 μ l pożywki (DMEM, 10% FBS, 1 % PenStrepGlu, 100 μ g/ml normocyny). Na płytce wcześniej umieszczono próbki (bakterie lub antygeny) w objętości 20 μ l. MDP (100 ng/ml, dla NOD2, InvivoGen, USA), LPS-Ultrapur *E. coli* O111:B4 (100 ng/ml dla TLR4, Sigma Aldrich, USA), Pam3SCK (1 μ g/ml dla TLR2, InvivoGen, USA) wykorzystano jako kontrolę pozytywną. Kontrolą negatywną był sterylny PBS. Na dołek naniesiono 20 μ l 1×10^7 CFU/dołek preparatu bakteryjnego bądź antygeny w końcowym stężeniu: 10 μ g/ml LTA lub peptydoglikanu i 30 μ g/ml polisacharydów. Płytki inkubowano w 37 °C, 5% CO₂ w przedziale od 6 do 16 godzin. Oznaczanie poziomu aktywacji receptorów wykonana dwoma metodami: 1) Pożywkę hodowlaną z nad komórek zebrano, a następnie oznaczono poziom IL-8 wykonując test ELISA (Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancje mierzono przy długości fali $\lambda=450$ nm (Biotek PowerWave HT, USA), albo 2) za pomocą komercyjnie dostępnego testu kolorymetrycznego HEK-Detection (InvivoGen, USA), w którym absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda= 630$ nm. Eksperyment wykonano 3-krotnie.

7.5.2 Badanie cytotoksyczności bakterii za pomocą testu SRB

Cytotoksyczność bakterii zbadano poprzez wykonanie testu wykorzystującego barwnik sulforodaminę B (test SRB, Sigma Aldrich, USA) (Vichai and Kirtikara, 2006). Test ten opiera się na kolorymetrycznym oznaczeniu białek w żywych komórkach eukariotycznych. Linie makrofagową RAW 264.7 inkubowano z żywymi i termicznie inaktywowanymi szczepami bakterii tak jak opisano w punkcie 7.5.1. Po 18 godzinnej stymulacji na dołek zawierający 200 μ l pożywki naniesiono 200 μ l zimnego roztworu 20 % kwasu trifluorooctowego (Sigma Aldrich, USA) i inkubowano przez 1 godzinę w 4 °C. Płytkę przepłukano 3 razy 1% kwasem octowym, a następnie naniesiono 50 μ l roztworu 0,04% SRB w 1% kwasie octowym (POCH, PL). Po 30 min inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę przepłukano 3-krotnie 1% kwasem octowym i dokładnie osuszono na papierowym ręczniku. Barwnik uwolniono z komórek poprzez dodanie 100 μ l 10 mM Tris pH=10,5 i wytrząsaniu przez 30 min (wytrząsarka do płytek mikrolitowych PSU-2T, Bionovo, PL). Wartość absorbancji zmierzono za pomocą spektrofotometru Biotek PowerWave HT przy długości fali $\lambda= 610$ nm. Eksperyment wykonano 2-krotnie.

7.5.3 Badanie produkcji azotynów (NO_2^-) przez linie komórkowe w odpowiedzi na bifidobakterie

Powstawanie, a następnie uwalnianie tlenu azotu przez komórki jest szybką reakcją immunologiczną w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Cząsteczka ta jest bardzo niestabilna i w kontakcie z powietrzem szybko tworzy azotyny i dwutlenek azotu. Tlenek azotu w organizmie jest cząsteczką efektorową, która pełni wiele zróżnicowanych funkcji np. działa jako neuromodulator w ośrodkowym układzie nerwowym, czy wpływa na motorykę jelit (Bryan and Grisham, 2007). Test Griess (Promega GmbH, DE) jest jednym z dostępnych komercyjnie kitów badających poziomu azotynów w warunkach *in vitro*. Linie makrofagową RAW 264.7 inkubowano z żywymi i termicznie inaktywowanymi szczepami bakterii tak jak opisano w punkcie 7.5.1. Po 18 godzinnej stymulacji, płytki odwirowano przy 1200 rpm przez 5 min, zebrano 50 μl płynu z nad hodowli i umieszczono na płytce 96-dołkowej. Wykorzystując pożywkę hodowlaną przygotowano świeży standard 100 μM roztworu azotynów (NO_2^-). Po nałożeniu krzywej standardowej oraz próbek, do dołków naniesiono 50 μl roztworu sulfanilamidu i inkubowano z wytrząsaniem przez 10 min w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem. Następnie dodano roztwór chlorowodoru N-1-naftyloetylenodiaminy (NED) w kwasie fosforanowym. Ponownie inkubowano 10 min. Absorbancję zmierzono przy długości fali $\lambda = 530 \text{ nm}$.

7.5.4 Badanie pochłaniania bakterii przez komórki nabłonka TC-1

Na płytkę 24-dołkową naniesiono $0,2 \times 10^6$ komórek/dołek linii TC-1 w objętości 1 ml zawieszonych w pożywce bez antybiotyków (DMEM, 10% FBS). Komórki pozostawiono na płytce przez 5 godzin by umożliwić im przytwierdzenie do powierzchni naczynia. W tym czasie żywe bądź termicznie inaktywowane szczepy *Bifidobacterium* wybarwiono Syto9 (λ wzbudzenia = 486-485 nm, λ emisji = 498-501 nm, ThermoFisher Scientific, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Do zawiesiny bakteryjnej zawierającej 1×10^8 komórek/ml dodano Syto9 tak by uzyskać stężenie końcowe 5 μM . Próbkę mieszano przez 1 min, a następnie inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej. Barwnik Syto9 umożliwia wyznakowanie kwasów nukleinowych (RNA i DNA) w żywych jak i martwych bakteriach. Na dołek płytki 24-dołkowej naniesiono $0,2 \times 10^7$ CFU/ml bakterii i inkubowano przez noc w 37 °C. Płyn z nad hodowli komórek TC-1 zebrano, a komórki przemyto 2-krotnie ciepłym PBSem. Komórki następnie zebrano za pomocą roztworu 0,25% trypsyny-EDTA o pH=7,2 zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.5 i umieszczono w PBSie. Próbkę analizowano za pomocą cytometru BD FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) badając fluorescencję w kanale FL1/FITC (λ emisji = 530/30 nm) oraz wielkość (i powierzchnię komórek). Komórki niebarwione posłużyły do umiejscowienia bramki oznaczającej komórki, które nie pochłonęły bakterii. Analiza wyników została oparta o średnią intensywność fluorescencji (MFI) w stosunku do niebarwionej kontroli. Eksperyment powtórzono 3-krotnie.

7.5.5 Badanie przekazywania bakterii pomiędzy komórkami nabłonka TC-1, a komórkami dendrytycznymi JAWS II

Początkowo prowadzono stymulację komórek TC-1 bifidobakteriami barwionymi Syto9™ tak jak opisano w punkcie 7.5.4, jednak po nocnej inkubacji i 2-krotnym płukaniu ciepłym PBSem na płytkę naniesiono komórki dendrytyczne JAWS II wybarwione barwnikiem PKH26 (Sigma Aldrich) w stężeniu $0,2 \times 10^7$ komórek/dołek w pożywce bez antybiotyków (MEM- alfa, 10% FBS). Komórki w kokulturze (1:1) inkubowano 4 godziny, następnie zebrano za pomocą roztworu 0,25% trypsyny-EDTA o pH 7,2 zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.5 i zawieszono w PBSie. Czerwony fluorochrom PKH26 (λ wzbudzenia=551 nm, λ emisji=567 nm) wiąże się ze membraną żywych komórek eukariotycznych. Próbkę analizowano za pomocą FACSCalibur w kanale FL2/PE (λ emisji=585/42) dla PKH26, FL1/FITC (λ emisji =530/30 nm) oraz pod względem wielkości (i powierzchni komórek). Komórki niebarwione posłużyły do umiejscowienia bramki oznaczającej komórki, które nie pochłonęły bakterii. Analiza wyników została oparta o średnią intensywność fluorescencji (MFI) w stosunku do niebarwionej kontroli. Eksperyment powtórzono 3-krotnie.

7.6 STYMULACJA KOMÓREK PIERWOTNYCH IZOLOWANYCH Z MYSZY BALB/C

Wszystkie badania na zwierzętach zostały zatwierdzone przez Komisję do Spraw Ochrony i Wykorzystania Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk i wykonane zgodnie z wydaną przez ten organ zgodą o numerze 91-2019.

Komórki dendrytyczne szpiku kostnego (BMDC) zostały wyizolowane z kości udowych i piszczelowych naiwnych myszy Balb/c zgodnie z procedurą opisaną przez Matheu i współp. (Matheu et al., 2008) z jedną różnicą, która dotyczyła składu pożywki hodowlanej. Zawiesinę komórek o gęstości 4×10^6 komórek/ml hodowano na szalce Petriego w objętości 10 ml pożywki RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 1% PenStrepGlu, 150 mg/ml gentamycyny (Sigma Aldrich, USA) i 20 ng/ml GM-CSF (Invitrogen, USA). W trzecim dniu hodowli do szalki dodano 10 ml świeżej pożywki, a w szóstym dniu delikatnie usunięto 10 ml pożywki i zastąpiono ją świeżą. Siódmego dnia hodowli komórki zebrano, zliczono i naniesiono w objętości 400 μ l i stężeniu $0,5 \times 10^6$ komórek/dołek na płytkę 48-dołkową. Dodano zawiesinę żywych i termicznie inaktywowanych bifidobakterii w objętości 100 μ l i stężeniu $0,5 \times 10^7$ CFU/dołek lub antygenów powierzchniowych o stężeniach 10 μ g/ml dla LTA lub peptydoglikanu i 30 μ g/ml dla polisacharydów. Po 20 godzinach określono stężenie cytokin (IL-10 i IL-12p70, IL-6 i TNF- α) w nadsączach zebranych z hodowli za pomocą testu ELISA Ready-Set-Go! (eBioscience, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Eksperyment powtórzono 2-krotnie.

Komórki immunologiczne śledziona (tzw. splenocyty) wyizolowano z samic myszy Balb/c uwrażliwionych na OVA. Myszy uczulono dwoma dawkami 10 μ g OVA (frakcja V, Sigma Aldrich,

USA) zmieszanej z 200 μ l 0,65 mg soli aluminium w PBS (Serva, DE), podawanych dootrzewnowo (i.p.) w dwutygodniowych odstępach. Siedem dni po drugiej immunizacji myszy uśmiercono poprzez przerwanie kręgów szyjnych. Śledziona została sterylnie usunięta i umieszczona w zimnym PBSie. Po przepuszczeniu komórek przez sito o porach 70 μ m, komórki umieszczono w pożywce RPMI 1640 z 10% FBS, 1% PenStrepGlu i 10 mM HEPES (Gibco, USA). Splenocyty w objętości 150 μ l i stężeniu 5×10^6 komórek/dołek umieszczono na płytce 96-dołkowej, a następnie re-stymulowano 500 mg/ml OVA (Worthington, USA) podanej w objętości 50 μ l oraz żywymi lub termicznie inaktywowanymi bifidobakteriami w objętości 50 μ l i stężeniu 5×10^7 CFU/dołek. Kontrolą pozytywną odpowiedzi cytokinowej na re-stymulację OVA były komórki stymulowane tylko OVA i PBS. Z kolei za negatywną kontrolę posłużyły niestymulowane komórki (podano tylko PBS). Inkubację prowadzono przez 72 godziny w 37 °C. Płytki zwirowano przy 1200 rpm przez 5 min, a w nadsączach z nad hodowli komórkowej oznaczono cytokiny IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ i IL-10 (Multiplex Mouse Cytokine/Chemokine, Millipore, Sigma Aldrich, USA) z wykorzystaniem Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, USA). Eksperyment został powtórzony 3-krotnie.

Izolację naiwnych splenocytów wykonano tak jak opisano powyżej jednak do stymulacji wykorzystano termicznie inaktywowany B1 7952 o stężeniu 5×10^7 CFU/dołek oraz jego antygeny w następujących stężeniach: 10 μ g/ml LTA i peptydoglikanu i 30 μ g/ml polisacharydów. Po 72-godzinnej hodowli oznaczono stężenie cytokin IL-6, IFN- γ i IL-10 za pomocą systemu Bio-Plex 200 (Bio-Rad, USA) z wykorzystaniem kitu Millipore Map Mouse Cytokine/Chemikone Panel (Sigma Aldrich, USA). Eksperyment został powtórzony 3-krotnie.

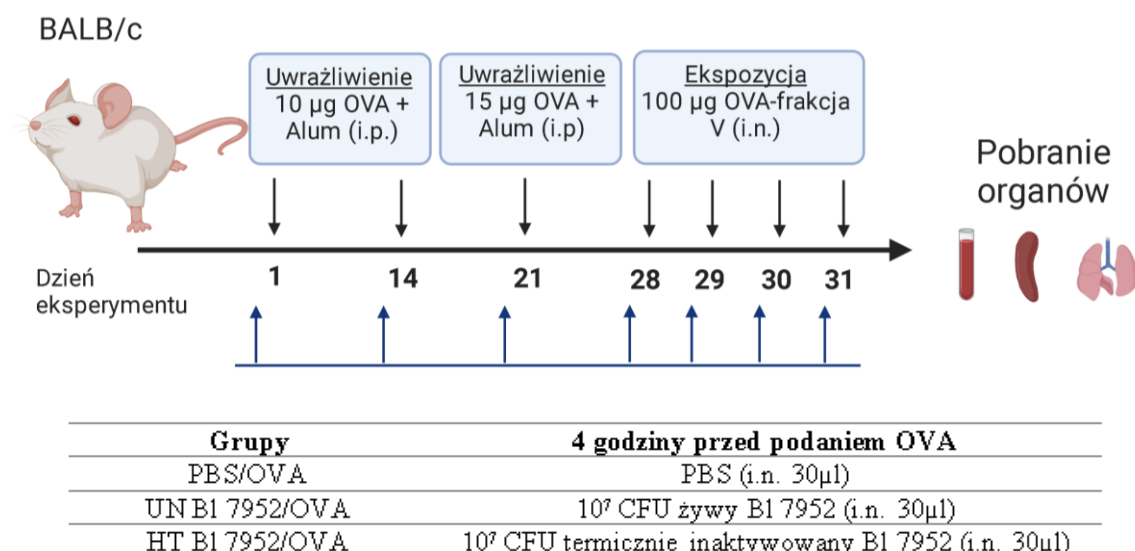
7.7 MODEL *IN VIVO* MYSIEGO MODELU UWRAŻLIWIENIA NA OWOALBUMINĘ

Samice myszy Balb/c w wieku 6 - 8 tygodni hodowano w klatkach typu IVC (Tecniplast, IT) z 12:12 godzinnym cyklem światło/ciemność, swobodnym dostępem do wody i sterylnej diety (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, DE). Doświadczenia (**Rycina 7**) zostały zatwierdzone przez Komisję do Spraw Ochrony i Wykorzystania Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk i wykonane zgodnie ze zgodą o numerze 91-2019. Myszy podzielono na trzy grupy (6 - 8 myszy w grupie):

I grupa to myszy, które otrzymały PBS i zostały uwrażliwione na OVA;

II grupa to myszy, które otrzymały żywe bakterie B1 7952 (UN B1 7952) i zostały uwrażliwione na OVA;

III grupa to myszy, które otrzymały termicznie inaktywowane bakterie B1 7952 (HT B1 7952) i zostały uwrażliwione na OVA.



Rycina 7 Schemat eksperymentu – myszy model alergii wziewnej indukowanej owoalbuminą (OVA). 6-8-tygodniowe samice myszy Balb/c ($n = 6-8$) były dootrzewnowo immunizowane 10 µg OVA + soli aluminium (Alum) w dniu 1 i 14 eksperymentu, dawkę przypominającą 15 µg OVA + soli aluminium podano w dniu 21. Siedem dni po trzeciej immunizacji rozpoczęto ekspozycję myszy na 100 µg OVA przez 4 kolejne dni. Żywe (UN B1 7952) bądź poddane obróbce termicznej (HT B1 7952) bifidobakterie w dawce 1×10^7 CFU/30 µl lub PBS podawano donosowo 4 godziny przed podaniem OVA. Myszy uśmiercono w 32 dniu eksperymentu (BioRender.com).

Myszom podano dootrzewnowo (i.p.) 10 µg OVA (frakcja V, SigmaAldrich, USA) i 0,65 mg soli aluminium rozpuszczonych w 200 µl PBS w dniu 1 i 14 eksperymentu. W 21 dniu eksperymentu myszom podano 15 µg OVA i 0,65 mg soli aluminium w PBS (200 µl). Siedem dni po ostatniej immunizacji myszy znieczulono 1,5% izofluranem (przepływ 0,5 litra/min) i podano donosowo (i.n.) 10⁷ CFU żywych lub termicznie inaktywowanych bakterii B1 7952 w 30 µl PBS. Grupie kontrolnej podawano tylko PBS. Cztery godziny później myszy ponownie znieczulono

1,5% izofluranem i podano 100 µg OVA w PBS w objętości 30 µl. Myszy uśmiercono poprzez przerwanie kręgow szyjnych. Zebrano krew obwodową, śledzionę oraz płyn przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowych (BALF) i płuca. Krew pozostawiono na lodzie przez godzinę do czasu powstania skrzepu, a następnie zwirowano (10 000 rpm, 10 min, 4 °C). Uzyskaną surowicę krwi obwodowej przeniesiono do świeżej probówki typu Ependorff i umieszczono w -40 °C. BALF uzyskano poprzez kaniulację odsłoniętej tchawicy i delikatne przepłukanie płuc dwoma objętościami 0,5 ml sterylnej soli fizjologicznej buforowanej fosforanem Dulbecco (D-PBS, Gibco, USA). Popłuczyny następnie odwirowano (1000 rpm, 7 min, w 4 °C). Zebrany płyn z osadu umieszczono w -40 °C. Osad komórkowy z kolei rozpuszczono w 200 µl RPMI 1640 i zliczono ich całkowitą ilość. Komórki w ilości 1×10^5 w 100 µl odwirowano w wirówce Cytospin (ThermoFisher Scientific, USA) przy 1000 rpm, przez 15 min, w 4 °C na szkiełku mikroskopowym, utrwalono metanolem i wybarwiono zestawem Dip-Quick-strain zgodnie z zaleceniami producenta (ThermoFisher Scientific, USA). Obserwacji dokonano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 40x. Charakterystykę komórek oparto na standardowych kryteriach morfologicznych (Sarate et al., 2021). Doświadczenie wykonano 2-krotnie.

7.7.1 Ocena poziomu cytokin produkowanych przez komórki śledziony stymulowane OVA

Splenocyty wyizolowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 7.6. Na dołek 96-dołkowej płytki nanoszono 5×10^6 komórek w objętości 200 µl pożywki RPMI 1640 z 10% FBS i 1% PenStrepGlu, a następnie re-stymulowano przy wykorzystaniu 500 µg/ml OVA lub pozostawiono bez stymulacji. Po 72 godzinach hodowli w 37 °C, 5% CO₂ zebrano nadsącz z hodowli komórkowej i oznaczono poziom wybranych cytokin szlaków Th1/Th2 tj. IL-4, IL-5, IL10, IL-13 i IL-17A (Multiplex Mouse Cytokine/Chemokine (Millipore, Sigma Aldrich, USA) za pomocą Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, USA). Poziom IFN-γ został oznaczony za pomocą testu ELISA (R&D Duo set System, USA) zgodnie z zaleceniami producenta.

7.7.2 Analiza płynu oskrzelowo-pęcherzykowego

Płyn oskrzelowo-pęcherzykowy przebadano na obecność cytokin IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IFN-γ i IL-17A (Mouse Cytokine/Chemikine Multiplex Immunoassay (Millipore, Sigma Aldrich, USA) zgodnie z zaleceniami producenta.

7.7.3 Ocena histopatologiczna płuc

Mniejszy płąt płucny utrwalono w 4% paraformaldehydzie (Sigma Aldrich, USA) przez 24 godziny, a następnie w 80% etanolu (POCH, PL) przez kolejne 24 godziny. Po zatopieniu w bloku parafinowym tkankę pocięto na 5 µm skrawki za pomocą mikrotomu rotacyjnego (Leica HistoCore BIOCUT, Leica Biosystems, USA). Szkiełka ze skrawkami barwiono metodą Schiffa kwasem

nadjodowym (metoda PAS), umożliwiającym wykrycie obecnego w komórkach glikogenu. Ocenę zmian histopatologicznych wykonano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 40x (Drinić et al., 2017). Ocenie poddano: a) stopień zapalenia przestrzeni okołonaczyniowych i okołoskrzelowych (stopień: 0= brak zmian, 1= mała liczba komórek, 2= umiarkowana liczba nacieków komórkowych, 3= duża liczba komórek), b) obecność leukocytów w przestrzeniach pęcherzykowych (0= brak komórek, 1= 2 - 4 komórek, 2= 4 - 10 komórek, 3= więcej niż 10 komórek) oraz c) liczbę komórek PAS-pozytywnych na 50 zliczonych komórek nabłonka oskrzelowo-pęcherzykowego (0= brak komórek, 1= mniej niż 12 komórek, 2= 12 - 25 komórek, 3= więcej niż 25 komórek). Wyniki histopatologiczne wyrażono jako sumę pojedynczych wyników podzieloną przez 3. Zasztyfrowane skrawki zostały ocenione przez dwóch niezależnych ekspertów.

7.7.4 Analiza poziomu przeciwciał w surowicy krwi obwodowej oraz BALF

Poziom przeciwciał specyficznych względem OVA w surowicy krwi obwodowej i BALF (izolacja w rozdziale Materiały i Metody 7.7) określono przy pomocy testu ELISA zgodnie z procedurą opisaną przez Milani i współp. (Milani et al., 2017b). Płytkę 96-dołkową (Nunc MaxiSorp, Sigma Aldrich, USA) pokryto 100 μ l OVA (5 μ g/ml) w PBSie i inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C. Płytkę przepłukano PBSem z 0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich, USA) i blokowano w 1% BSA w PBSie (ThermoFisher Scientific, USA) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Próbki surowicy rozcieńczano 1:10 000 dla oznaczenia przeciwciał IgG1, 1:100 dla przeciwciał IgG2a i 1:10 dla przeciwciał IgA. Dla oznaczenia przeciwciał w BALF wykonano rozcieńczenia 1:10 dla przeciwciał IgG1, a do pozostałych wykorzystano nierozcieńczone próbki. Po 2 godzinnej inkubacji płytkę przepłukano i naniesiono szczurze przeciwciała anti-mysie IgG1, IgG2a, IgA (Pharmingen, BD Biosciences, USA) w rozcieńczeniu 1:500. Następnie naniesiono mysie anti-szczurze przeciwciała IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP) w stężeniu 1:2000 (Jackson Immuno Labs, USA). Poziomy przeciwciał zmierzono poprzez badanie $\lambda=405$ nm z wykorzystaniem Infinite M200 (Tecan, CH).

Całkowitą ilość przeciwciał IgA w surowicy i BALF określono testem ELISA firmy Bethyl (Mouse IgA ELISA Quantitation Set, USA) wykonanym zgodnie z instrukcją producenta. Płytkę 96-dołkową opłaszczono przeciwciałem IgA (100 μ l/dołek) w rozcieńczeniu 1:100 w 0,05 M buforze węglanowym o pH 9,6 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę. Następnie przemyto płytkę 5-krotnie 0,05% Tween 20 w PBSie i blokowano 200 μ l 1% BSA w PBSie. Po 30 min płytkę ponownie przepłukano 5-krotnie i naniesiono 100 μ l krzywej standardowej lub próbki. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę przepłukano 5-krotnie i naniesiono 100 μ l przeciwciała z HRP (rozcieńczenie 1: 30 000, Bethyl, USA). Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, płytkę przepłukano 5-krotnie i naniesiono 100 μ l roztworu 3,3',5,5'- tetrametylobenzodynowym (TMB, BD Bioscience, USA). Płytkę inkubowano 15 min w ciemnym miejscu, a reakcję zatrzymano poprzez dodanie 100 μ l 2 M kwasu siarkowego VI

(H₂SO₄, POCH, PL). Wyniki odczytano za pomocą spektrofotometru Biotek PowerWave HT przy długości fali $\lambda=450$ nm.

Poziom przeciwciał IgE specyficznych względem OVA w surowicy krwi obwodowej i BALF oznaczono ilościowo poprzez badanie degranulacji szczyrzyc białaczkowych komórek bazofilowych (RBL-2H3) (Górska et al., 2017). Komórki RBL-2H3 naniesiono na dołek w ilości 4×10^4 i uwrażliwiono biernie poprzez inkubację z surowicą w stężeniu 1:810 lub płynem BALF w stężeniu 1:20 przez 2 godziny w temperaturze 37 °C. Następnie komórki przemyto PBSem i dodano 250 μ l 0,6 μ g/ml OVA. Komórki inkubowano kolejne 30 min w temperaturze 37 °C. Płyn z hodowli zebrano, a następnie inkubowano z 4-metyloumbelliferylo-N-acetylo- β -D-glukozaminidem (Sigma Aldrich, USA), związku fluorescencyjnego, który pozwolił na oznaczenie poziomu β -heksozoaminidazy. Pomiar fluorescencji wykonano poprzez wzbudzenie fali przy $\lambda=360$ nm i odczytanie wyniku przy $\lambda=465$ nm z wykorzystaniem Infinite M200 (Tecan Group Ltd, CH). Wyniki odniesiono do próbki referencyjnej, w której zamiast surowicy czy BALF dodano 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA). Związek ten indukuje uwolnienie wszystkich granuli zamkniętych w komórkach RBL-2H3. Wartość ta została określona jako 100% uwolnienia β -heksozoaminidazy.

Test ELISA z wykorzystaniem całych komórek bakteryjnych wykonano na 96-dołkowej płytce (Nunc MaxiSorp, USA) (Koba et al., 2016), na którą naniesiono 100 μ l zawierających 25 μ g żywych bądź termicznie inaktywowanych bifidobakterii w PBSie. Płytkę natychmiast odwirowano przy 1200 rpm przez 10 min. Usunięto 80 μ l PBSu, a na dołki naniesiono 100 μ l 0,1% glutaraldehydu (Sigma Aldrich, USA) i inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Pipetą zebrano 100 μ l mieszaniny, a następnie płytkę blokowano 0,1% BSA w PBSie z 0,1 M gliceryną (POCH, PL) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Płytkę przemyto 0,05% Tweenem 20 w PBSie (Sigma Aldrich, USA), a później inkubowano 0,25% BSA w PBSie z dodatkiem chlorku magnezu (POCH, PL) przez noc w temperaturze 4 °C. Po wypłukaniu PBSu, na płytkę naniesiono próbki BALF w rozcieńczeniu 1:1 lub surowicy w rozcieńczeniu 1:10 i inkubowano 3 godziny w temperaturze pokojowej. By wykryć IgA swoiste dla bakterii wykorzystano przeciwciała IgA sprzężonych z HRP w rozcieńczeniu 1:10 000 (Bethyl, USA). Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę przepłukano 5-krotnie i naniesiono 100 μ l roztworu TMB. Po 30 min inkubacji w ciemnym miejscu reakcję zatrzymano 100 μ l 2M H₂SO₄. Wyniki odczytano z wykorzystaniem spektrofotometru Biotek PowerWave HT przy długości fali $\lambda=450$ nm.

7.8 IZOLACJA ANTYGENÓW POWIERZCHNIOWYCH

7.8.1 Peptydoglikan

Izolacja peptydoglikanu (PGN) została wykonana według protokołu Chateau i współp. (Chateau et al., 2019). 1 g suchej masy bakteryjnej rozpuszczono w 100 ml 25 mM buforu fosforanowego (2,973 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 0,926 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, POCH, PL) w wysokiej kolbie stożkowej. Umieszczono na mieszadle magnetycznym ustawionym na szybkość 300 obr/min. Następnie dodawano kroplami 100 ml wrzącego 8% dodecylosiarczan sodu (SDS, Sigma Aldrich, USA). Całość schłodzono do temperatury pokojowej i zwirowano na ultrawirówce Sorvall WV+ (45 000 x g, 30 min, 15 °C, ThermoFisher Scientific, USA). Osad poddano ponownej ekstrakcji w warunkach opisanych powyżej. Po zwirowaniu na ultrawirówce (45 000 x g, 30 min, 15 °C) osad przepłukano 6-krotnie 25 mM buforem fosforanowym, w celu pozbycia się SDSu, a następnie zliofilizowano do dalszego oczyszczania.

7.8.1.1 Oczyszczanie peptydoglikanu

2 g PGN zawieszono w 1 ml 25 mM buforu fosforanowego, a następnie dodano 210 µg/ml DNAzę (Sigma Aldrich, USA), 210 µg/ml RNAzę (Sigma Aldrich, USA) i 10 mM chlorku magnezu (MgCl_2 , POCH, PL) (Chateau et al., 2019). Inkubowano przez 6-8 godzin na wytrząsarce (Eppendorf Thermomixer Compact, USA) w temperaturze 37 °C. Dodano α -amylazy (Sigma Aldrich, USA) w stężeniu końcowym 100 µg/ml i inkubowano kolejną godzinę. Po dodaniu proteazy (Sigma Aldrich, USA) w stężeniu końcowym 447 µg/ml i całonocnej inkubacji w 37 °C wszystkie enzymy inaktywowano poprzez 2 godzinną inkubację w temperaturze 60 °C. Peptydoglikan zwirowano przy 48 000 x g, 20 min, 15 °C, osad rozpuszczono w 48% kwasie fluorowodorowym (Sigma Aldrich, USA) i inkubowano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Zawiesinę dializowano w woreczkach dializacyjnych o masie cząsteczkowej odcięcia 2 kDa (Slide-a-Lyzer, VWR, PL) przez 24 godziny zmieniając wodę co najmniej 3-krotnie. Liofilizowany peptydoglikan następnie zawieszono w 50 mM MES o pH 6,0 (Sigma Aldrich, USA). Do zawiesiny dodano lizozymu o stężeniu 2mg/ml (Sigma Aldrich, USA), 100 U/ml mutanolizyny (Sigma Aldrich, USA) i 10 mM MgCl_2 , a następnie inkubowano przez noc w 37 °C na kołysce. Po inaktywacji w 100 °C przez 10 min peptydoglikan zliofilizowano do dalszych badań. Frakcje rozdzielono na rozpuszczalną i nierozpuszczalną poprzez rozpuszczenie 1 mg PGN w ultraczystej wodzie i odstawieniu na 30 min. Frakcje po rozdzieleniu ponownie zliofilizowano.

7.8.2 Kwasy lipotejchojowe

Izolacja kwasów lipotejchojowych (LTA) została wykonana zgodnie z protokołem Moratha i współp. (2001). Rozpuszczono 4 g bakteryjnej masy w 30 ml ultraczystej wody i sonikowano 10 min (Sonikator VCX500, Labo Plus, PL). Następnie dodano 30 ml n-butanolu i inkubowano na

wytrząsarce (Multitron Standard Infors HT, Agema-Lab S.C., PL) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Wirowano przy 11 000 rpm, 20 min, 4 °C (Hermle Centrifuge Z 36MK, Labnet International, PL). Mieszaninę zebraną z osadu pozostawiono do momentu rozdzielenia na dwie fazy, tak by następnie zebrać tylko fazę wodną zawierającą LTA. Próbka została następnie zliofilizowana.

7.8.2.1 Oczyszczanie LTA

LTA oczyszczano na kolumnie o wymiarach 16 x 400 mm (XK 16/40, VWR, PL) wypełnionej 120 ml złoża Octyl Sepharose CL-4B (Sigma Aldrich, USA) z wykorzystaniem systemu GE AKTA Purifier 100 (GE Healthcare, DE). Frakcje eluowano w gradiencie 0-60% n-propanolu (POCH, PL) w 15% n-propanolu w 0,1 M octanie sodu o pH 4,7 (POCH, PL). Frakcje zawierające LTA zidentyfikowano na podstawie testu DuBois (rozdział Materiały i Metody 7.8.2.2). Wybrane frakcje zawierające reszty cukrowe połączono i zliofilizowano.

7.8.2.2 Kolorymetryczny pomiar reszt cukrowych metodą DuBois

Zawartość reszt cukrowych w kwasach lipotejchojowych i polisacharydach monitorowano metodą DuBois (DuBois et al., 1956). Na płytkę 96-dołkową naniesiono 30 µl frakcji, następnie dodano 30 µl 5% fenolu (POCH, PL) i 150 µl stężonego H₂SO₄. Po 30 min inkubacji płytkę odczytano w spektrofotometrze Biotek PowerWave HT przy długości fali $\lambda=490$ nm.

7.8.3 Polisacharydy

Izolację polisacharydów (PS) wykonano zgodnie z protokołem opisanym przez Górską i współp. (Górska et al., 2017). Zawieszono 10 g masy bakteryjnej w 50 ml wodzie ultraczystej i sonikowano w łaźni ultradźwiękowej P-line (ThermoFisher Scientific, USA) przez 5-10 min. Do zawiesiny dodano 10 ml 60% kwasu trichlorooctowego (Sigma Aldrich, USA) i inkubowano na wytrząsarce w temperaturze pokojowej przez 2,5 godziny. Następnie zawiesinę zwirowano przy 13 000 rpm przez 20 min w 4°C (Hermle Centrifuge Z 36MK, PL). Mieszaninę z osadu zebrano, a sam osad wykorzystano do powtórnej ekstrakcji. Do połączonego wodnego roztworu z obu izolacji dodano 5 objętości zimnego etanolu (POCH, PL) i inkubowano przez noc w -20 °C. Następnego dnia zawiesinę zwirowano przy 13 000 rpm przez 50 min w temperaturze 4 °C. Osad rozpuszczono w niewielkiej ilości wody ultraczystej i pozostawiono do ogrzania w temperaturze pokojowej. Zawiesinę dializowano przez 24 godziny w woreczkach dializacyjnych o masie cząsteczkowej odcięcia 2 kDa (Slide-a-Lyzer, VWR, PL), zamrożono w -20 °C i następnie zliofilizowano.

7.8.3.1 Oczyszczenie polisacharydów

PS rozpuszczono w 50 mM Tris-HCl o pH 7,5 zawierającym DNAzę i RNAzę (Sigma Aldrich, USA) o końcowych stężeniach 210 µg/ml oraz 10mM MgCl₂ (POCH, PL). Zawiesinę inkubowano przez 6 godzin w 37 °C, po czym dodano proteazę ze *Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich, USA) o stężeniu końcowym 447 µg/ml i pozostawiono na noc w 37 °C. Zamrożono w -20 °C i zliofilizowano. Polisacharydy oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej, na złożu DEAE Sephadex A25 (GE Healthcare, DE) upakowanej w kolumnie o wymiarach 16 x 20 mm (XK 16/20, VWR, PL).

Fracje eluowano w gradiencie 2 M NaCl (POCH, PL) w 20 mM Tris-HCl o pH 8,2 (POCH, PL). Do dalszych etapów oczyszczania wybrano tylko te frakcje, w których zidentyfikowano reszty cukrowe metodą DuBois (rozdział Materiały i Metody 7.8.2.2). Wybrane frakcje połączono i zliofilizowano. Następnie przeprowadzono rozdział z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. Do tego celu wykorzystano kolumnę o objętości 200 ml i wymiarach 16 x 400mm (XK16/40, VWR, PL) zawierającą złożę Toyopearl HW-55S (Tosoh Bioscience GmbH, DE). Eluentem był 0,1 M octan sodu (POCH, PL). Frakcje przebadano na obecność reszt cukrowych (metoda DuBois, Materiały i Metody 7.8.2.2), następnie wybrane frakcje połączono, dializowano w woreczkach dializacyjnych o masie cząsteczkowej odcięcia 2 kDa przez 24 godziny i zliofilizowano.

7.9 SPEKTROSKOPIA JĄDROWEGO REZONANSU MAGNETYCZNEGO (NMR)

Identyfikację polisacharydów i kwasów lipotejchojowych wykonano za pomocą spektroskopii NMR. 4 mg badanego związku rozpuszczono w 160 µl D₂O (99,96 %, Sigma Aldrich, USA). Pomiary wykonano w probówkach o średnicy 3 lub 5 mm. Do tego celu wykorzystano NMR Avance III 600 MHz (Bruker Biospin, CH) wyposażonego w kriosonde CryoQCI 5 mm. Przesunięcia chemiczne wyznaczono na podstawie eksperymentów jednowymiarowych ¹H przeprowadzonych w temperaturze pokojowej (298K). Analizę wyników wykonano przy wykorzystaniu oprogramowania TopSpin 4.0.7 (Bruker BioSpin, CH).

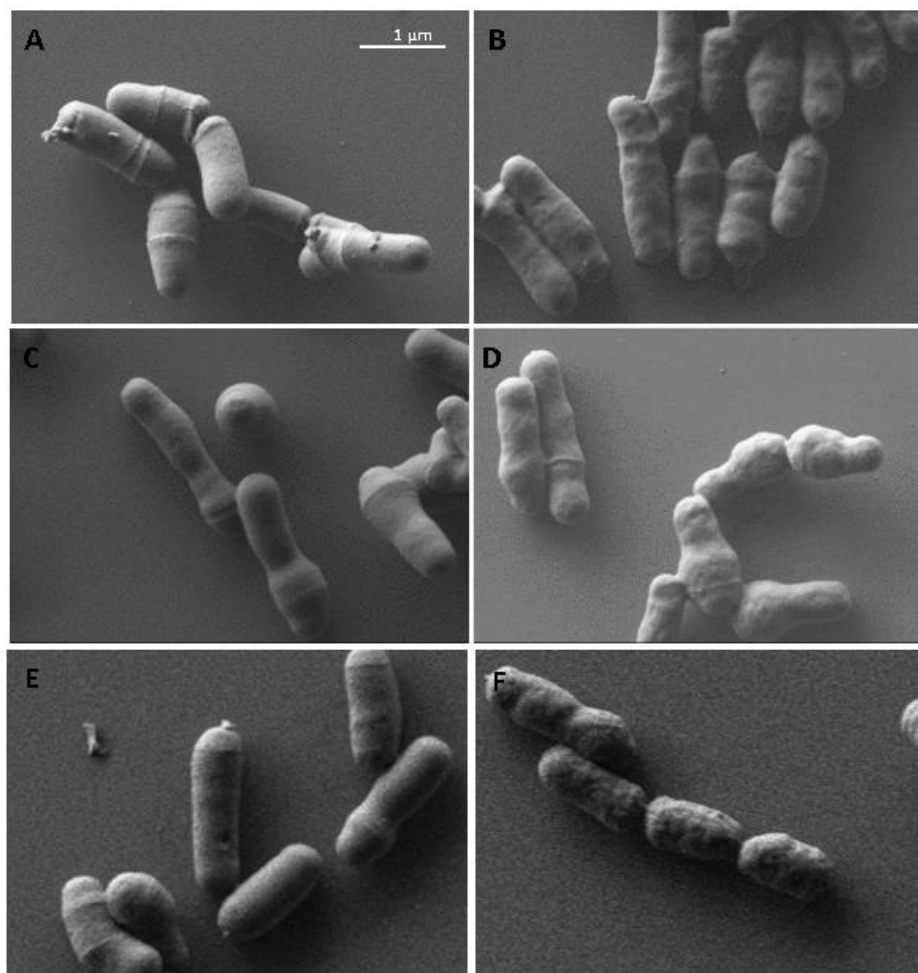
7.10 ANALIZA STATYSTYCZNA

Zaprezentowane wyniki zostały przedstawione jako średnia z błędem standardowym średniej (\pm SEM). Wyniki uzyskane podczas eksperymentów zostały przeanalizowane w programie GraphPad Prism 8 i 9. W badaniach *in vitro* w których do stymulacji wykorzystywano 8 szczepów nietraktowanych i termicznie inaktywowanych bakterii wykorzystano testy: t-studenta i Two-way ANOVA z porównaniem Dunetta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05; ns, bez statystycznego znaczenia. W przypadku badań *in vivo* nad szczepem B1 7952 oraz w badaniach antygenów powierzchniowych zastosowano test One-way ANOVA z porównaniem Dunetta, a wyniki istotne statystycznie ze względu na zbyt dużą ilość danych oznaczono >#

8 WYNIKI

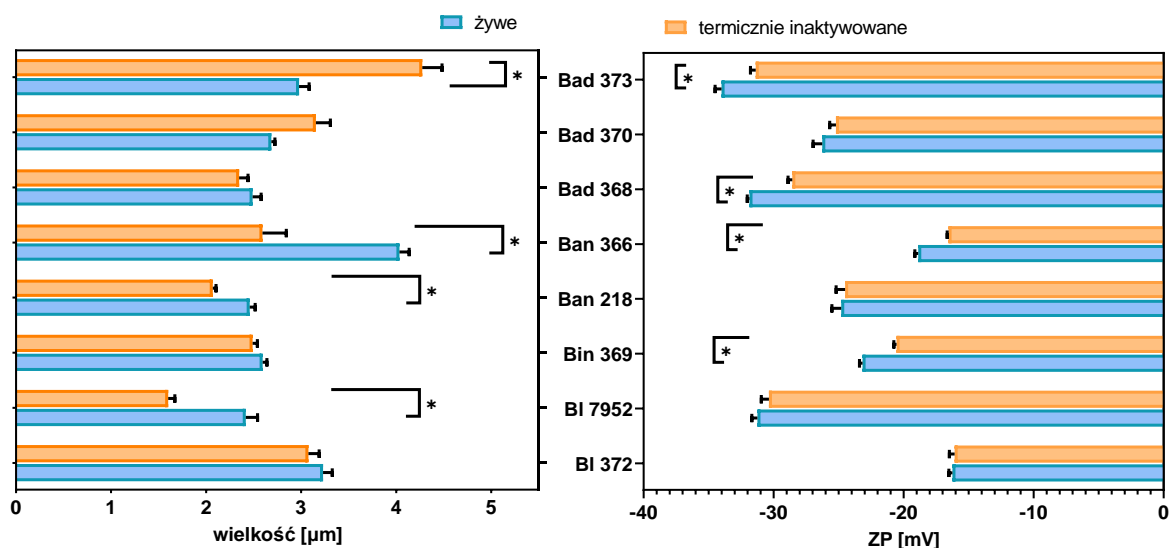
8.1 CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH SZCZEPÓW *BIFIDOBACTERIUM*

W celu oceny różnic morfologicznych między szczepami *Bifidobacterium* oraz tych wynikających z inaktywacji termicznej, wykonano zdjęcia za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Przykładowe obrazy zostały zamieszczone na **Rycinie 8**. Wszystkie przebadane żywe bakterie posiadają gładką powierzchnię komórki i wykazują polimorfizm z przewagą komórek o kształcie pałeczek i maczug. Tylko kilka pojedynczych komórek przyjmowało kształt „bifid”. Godzinna inaktywacja w temperaturze 65 °C prowadziła do niewielkich zmian morfologicznych na powierzchni komórek bakteryjnych, która stała się bardziej nieregularna i porowata (**Rycina 8**). Nie zaobserwowano jednak by komórki uległy zniszczeniu, ponieważ nie znaleziono fragmentów uszkodzonej ściany komórkowej.



Rycina 8 Inaktywacja termiczna w temperaturze 65 °C zmienia strukturę powierzchni bifidobakterii. Obrazy LV-SEM (A) żywych i (B) termicznie inaktywowanych komórek Bl 7952 oraz (C) żywych i (D) termicznie inaktywowanych komórek Bad 373, (E) żywych i (F) termicznie inaktywowanych komórek Bad 370. Skala (1 µm) dotyczy wszystkich prezentowanych obrazów.

Badanie wielkości komórek za pomocą DLS wykazało, że wszystkie analizowane żywe szczepy mieszczą się w przedziale wielkości od 2 do 4 μm . Najmniejszy rozmiar komórek zaobserwowano w przypadku szczepu BI 7952, który to miał tylko 2,417 μm ($\text{SEM} \pm 0,124$), a największy dla Ban 366 mający 4,034 μm ($\text{SEM} \pm 0,102$) (**Rycina 9**).



Rycina 9 Różnice fizykochemiczne między żywymi i termicznie inaktywowanymi bifidobakteriami. Pomiar wielkości (μm) i potencjału zeta (mV) nietraktowanych (niebieskie słupki) i poddanych inaktywacji termicznej (pomarańczowe słupki) szczepów bifidobakterii wykonanych przy użyciu Zetasizer Nano ZS. Dane przedstawiono jako średnią \pm SEM z 5 pomiarów; różnice statystyczne analizowano za pomocą testu *t*-Studenta między żywymi a termicznie inaktywowanymi, * różnica istotna statystycznie $p < 0,05$.

Uzyskane parametry są typowe dla bakterii z gatunku *Bifidobacterium*, które z danych literaturowych mają rozmiar komórki mieszczący się w przedziale od 0,5 do 8 μm (Bergey et al., 2012). Wyniki pomiarów DLS dla inaktywowanych bakterii wskazały na istotny wpływ termicznej obróbki na rozmiar bakterii. Dla większości badanych szczepów obserwowano zmniejszenie rozmiarów komórek po termicznej inaktywacji. Przykładem jest tu BI 7952, którego rozmiar komórki zmniejszył się do 1,602 μm ($\text{SEM} \pm 0,070$). Co ciekawe, szczep Bad 373 jako jedyny znacząco zwiększył rozmiar komórek po inaktywacji termicznej. Z kolei badania zmiany potencjału zeta uzyskane za pomocą ELS wskazały na wysokie zróżnicowanie wartości ładunku komórek w zależności od szczepu. Najniższy ładunek komórkowy posiadały Bad 373 ($-34,0 \pm 0,503$), Bad 368 ($-31,86 \pm 0,168$) i BI 7952 ($-31,24 \pm 0,435$), a najwyższy Ban 366 ($-18,88 \pm 0,258$) i BI 372 ($-16,24 \pm 0,277$). Termiczna inaktywacja, tylko w przypadku czterech szczepów prowadziła do znaczącej statystycznie zmiany ładunku komórki. U szczepów Bin 369, Bad 373, Bad 368, Ban 366 doszło do wzrostu ładunku na powierzchni komórek. Nie wykazano jednak by zachodziła jakakolwiek korelacja między zmianami potencjału zeta, a wielkością komórki ($p = 0,3491$).

Bakterie po hodowli zwirowano, zawieszono w sterylnym PBSie i pozostawiono w temperaturze 4 $^{\circ}\text{C}$ na 48 i 72 godziny. Po tym czasie określono CFU szczepów, a wyniki

zamieszczono w **Tabeli 6**. U wszystkich szczepów bakterii obserwowano spadek przeżywalności bifidobakterii po 48 godzinach za wyjątkiem szczepu Ban 218. Największy spadek ilości bakterii zdolnych do dalszego podziału zaobserwowano dla szczepu Bad 373. Spadek przeżywalności postępował wraz z wydłużaniem czasu inkubacji w PBSie. Po 72 godzinach największy spadek zaobserwowano dla szczepu Bin 369, gdzie ilość bakterii spadła do 10^3 CFU/ml oraz BI 372, których liczba sięgała 10^4 CFU/ml.

Tabela 6 Określenie przeżywalności bifidobakterii w PBS po 48 i 72 godzinnej inkubacji

Szczep	Wyjściowa wartość CFU [komórek/ml]	Przeżywalność bakterii w PBS wyrażona w CFU	
		po 48 godzinach	po 72 godzinach
BI 372	$15,147 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,66 \times 10^4$
BI 7952	$7,463 \times 10^8$	$0,87 \times 10^8$	$9,58 \times 10^5$
Ban 366	$36,73 \times 10^8$	$0,97 \times 10^8$	$6,38 \times 10^7$
Ban 218	$3,66 \times 10^8$	$3,59 \times 10^9$	$4,65 \times 10^8$
Bad 368	$3,41 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$9,95 \times 10^6$
Bad 370	$5,228 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$7,36 \times 10^7$
Bad 373	$16,94 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$5,09 \times 10^5$
Bin 369	$46,146 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$6,82 \times 10^3$

Podsumowując, obrazowanie komórek bakterii za pomocą metod mikroskopowych wykazało, że termiczna inaktywacja nie zaburza integralności ściany komórkowej. Ponadto ocena właściwości fizycznych takich jak wielkość i ładunek wykazała, że w niektórych szczepach dochodzi do zmian zewnątrzkomórkowych. Dodatkowo oszacowano, że preparaty żywych bakterii nie powinny być wykorzystywane w dalszych eksperymentach po 48 godzinach od momentu ich przygotowania. W dalszych etapach pracy „żywe” bakterie zostały określone terminem „nietraktowane”.

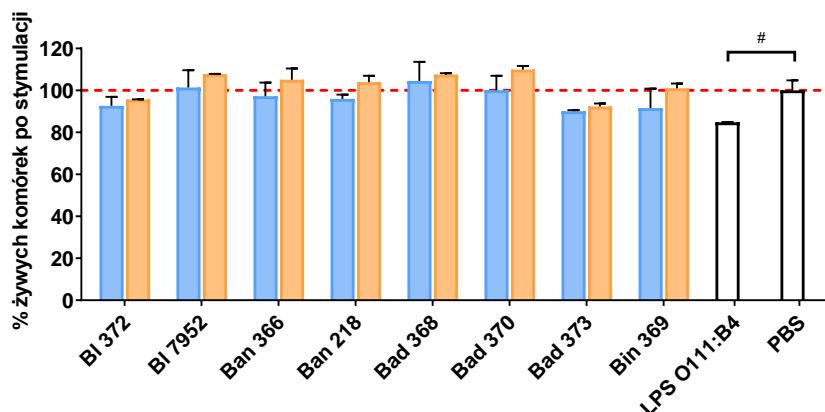
8.2 CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOMODULUJĄCYCH TERMICZNIE INAKTYWOWANYCH SZCZEPÓW *BIFIDOBACTERIUM*

W celu określenia właściwości immunomodulujących badanych szczepów wykonano szereg analiz *in vitro* z wykorzystaniem różnych typów linii komórkowych. Istotne było również określenie jak inaktywacja termiczna wpłynie na właściwości biologiczne bakterii.

8.2.1 Wpływ bifidobakterii na komórki układu odpornościowego

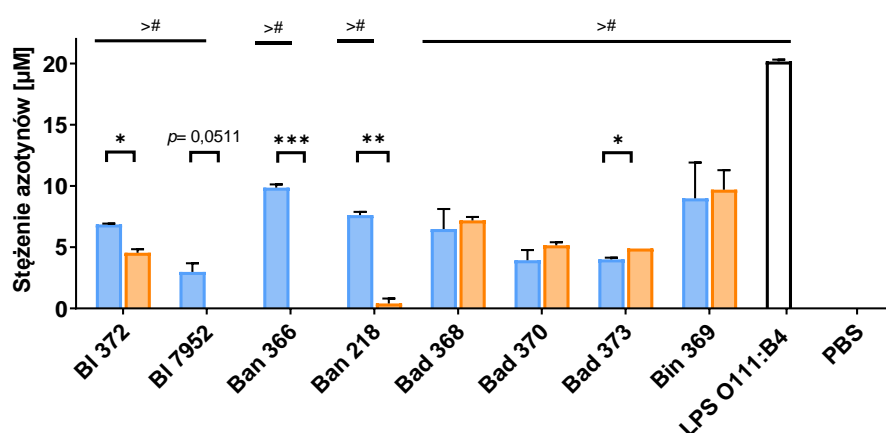
W pierwszym etapie określono jak bifidobakterie wpływają na komórki makrofagowe. Określono ich stopień proliferacji, zdolność do produkcji tlenu azotu oraz profil wytwarzanych cytokin (**Rycina 10 - 12**). Mieloidalne komórki układu odpornościowego są głównymi komórkami odpowiedzialnymi za zapoczątkowanie reakcji alergicznej w organizmie.

Ocena cytotoksyczności bakterii wykazała, że stymulacja komórek RAW 264.7 bifidobakteriami w stosunku 1:10 (ilość komórek makrofagowych: bakterii) nie zwiększa proliferacji w porównaniu do kontroli nietraktowanej (**Rycina 10**). Bakterie nie są też toksyczne dla komórek. Nie obserwowano różnic w aktywności pomiędzy nietraktowanymi, a termicznie inaktywowanymi bakteriami.



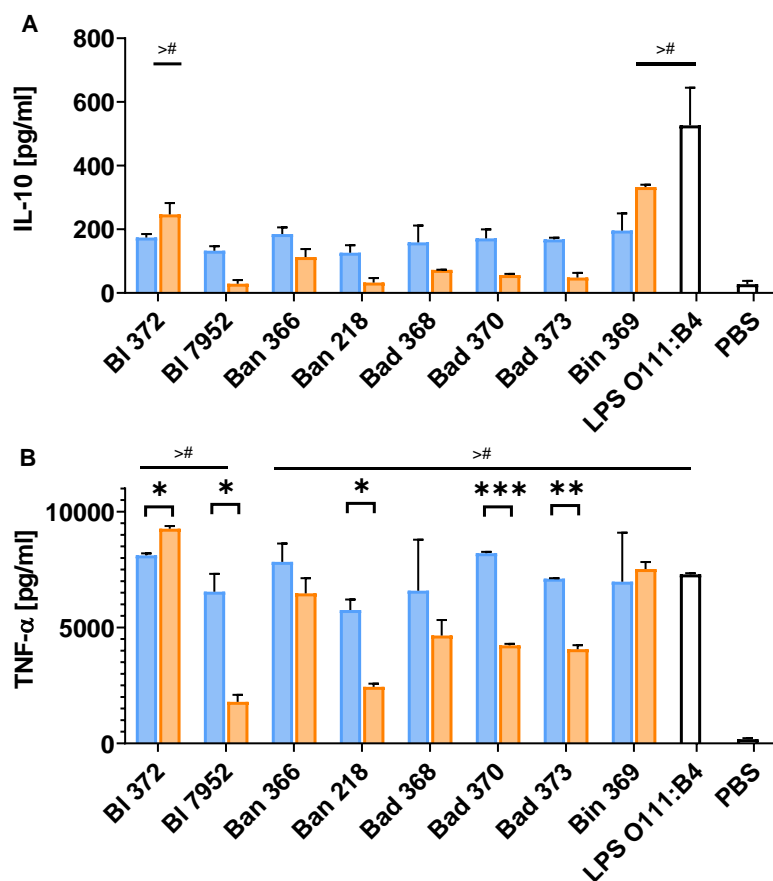
Rycina 10 Ocena cytotoksyczności badanych szczepów *Bifidobacterium* z wykorzystaniem linii makrofagów/monocytów RAW 264.7. Komórki stymulowano nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami przez 18 godzin. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1µg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Bezpośrednim wskaźnikiem ilości żywych komórek jest ilość białek, które związały się z sulforodaminą B. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test *t*-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test Dunetta 2 way-ANOVA wykonano w odniesieniu do komórek niestymulowanych, # $p < 0,05$.

Badanie azotynów wykonano w świeżo zebranych nadsączach pochodowlanych komórek makrofagowych RAW 267.4. Wyniki wskazują, że wszystkie nietraktowane szczepy bifidobakterii indukują produkcję NO₂⁻ jednak jego poziom nie jest wysoki w porównaniu do poziomu uzyskanego po stymulacji komórek LPSEM i nie przekracza 10 μM (**Rycina 11**). Najniższy poziom NO₂⁻ uzyskano dla szczepu BI 7952 (2,988 ± 0,703), a najwyższy dla Ban 366 (9,980 ± 0,269). Interesującym była obserwacja, iż w przypadku czterech szczepów (BI 7952, BI 372, Ban 366, Ban 218) termiczna inaktywacja obniża znacząco zdolność bakterii do indukcji NO₂⁻ i tylko jeden szczep Bad 373 indukował wzrost produkcji tej cząsteczki po termicznej inaktywacji. U szczepów Bad 368, Bad 370 i Bin 369 nie zaobserwowano wpływu termicznej inaktywacji na zdolność szczepów do indukcji NO₂⁻.



Rycina 11 Oznaczenie poziomu azotynów (NO₂⁻) w nadsączach pochodowlanych linii RAW 264.7. Komórki stymulowano nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami przez 18 godzin. Do wykonania testu Greiss wykorzystano tylko świeżo zebrany nadsącz. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 μg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001,. Test Dunetta 2 way-ANOVA wykonano w odniesieniu do komórek niestymulowanych, istotne statystycznie #

Stymulacja linii makrofagowej RAW 264.7 wykazała, że z pośród badanych cytokin i chemokin (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, MCP-1, GM-CSF, interferon typu I, TNF-α i TGF-β) linia komórkowa w odpowiedzi na bakterie produkowała tylko IL-10 i TNF-α. Nietraktowane bakterie wykazują tendencję do indukcji IL-10, niemniej jednak wartości te nie są statystycznie istotne, gdy porównamy je do kontroli PBS. Tylko stymulacja komórek RAW 264.7 inaktywowanymi szczepami BI 372 i Bin 369 prowadzi do statystycznie istotnego wzrostu poziomu IL-10 w stosunku do PBSu (**Rycina 12A**).

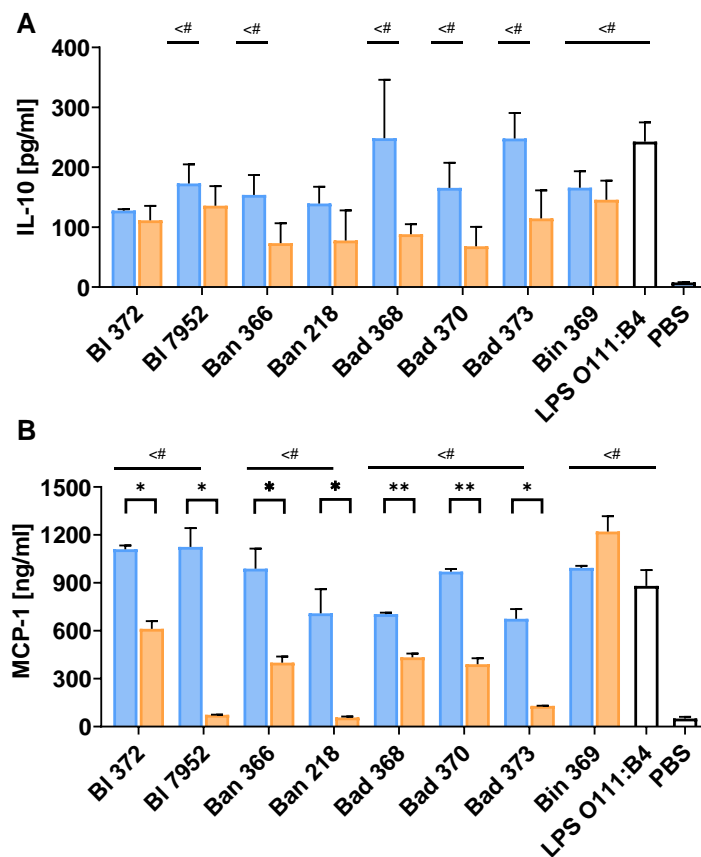


Rycina 12 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na wytwarzanie cytokin przez linię makrofagów RAW 264.7. Poziom (A) IL-10 i (B) TNF- α w nadsączach komórek został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 μ g/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie $> \#$.

W przypadku TNF- α wszystkie nietraktowane oraz termicznie inaktywowane bakterie (za wyjątkiem inaktywowanych BI 7952) indukują wytwarzanie znacznej ilości tej cytokiny w porównaniu do kontroli (**Rycina 12B**). W przypadku większości szczepów można zaobserwować, że inaktywacja skutkuje spadkiem zdolności do indukcji TNF- α w komórkach RAW 264.7. Tylko po stymulacji szczepem BI 372 widać, że termiczna inaktywacja zwiększa zdolności szczepu do indukcji większych ilości TNF- α .

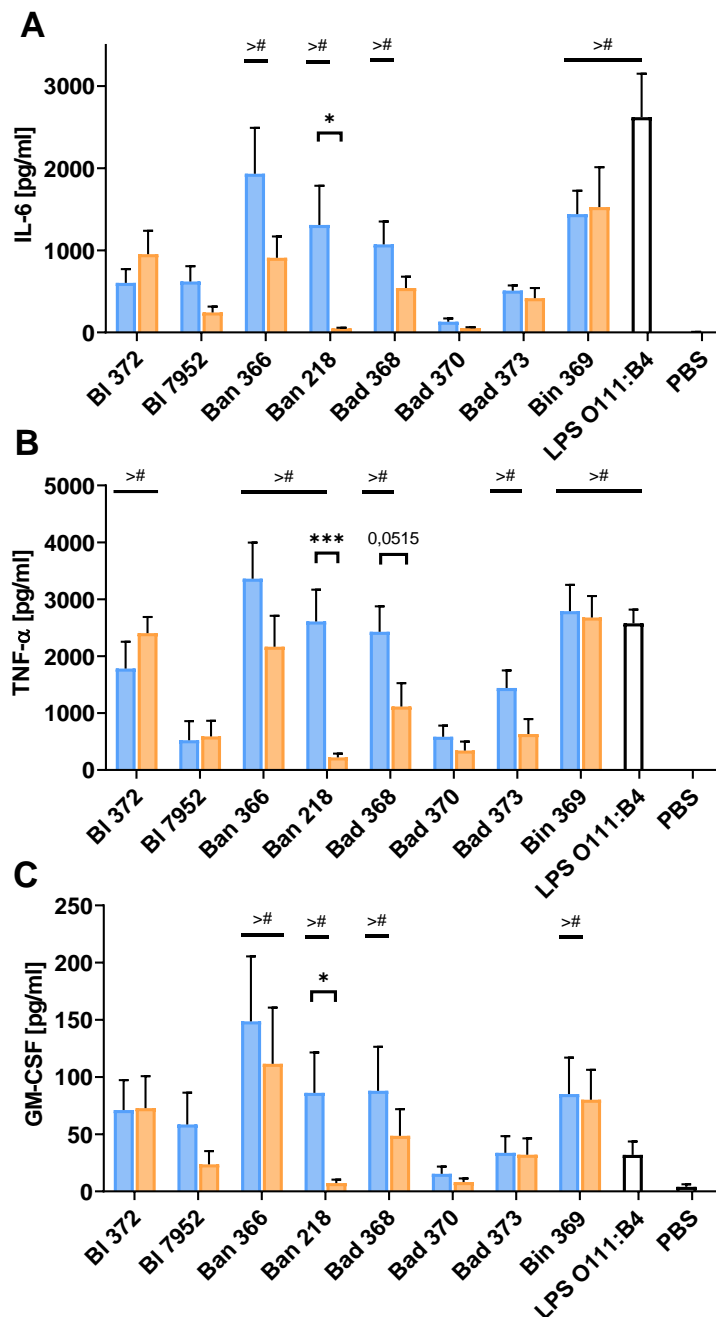
Właściwości immunomodulujące sprawdzono również na innych liniach makrofagowych biorąc pod uwagę dane literaturowe wskazujące, że szczepy bakteryjne mogą w odmienny sposób wpływać na różne linie makrofagowe w zależności od miejsca ich pochodzenia. W przypadku linii iBMDM również sprawdzono cytokiny należące do szlaków Th1/Th2/T_{reg} (IL-4, IL-5, IL-6,

IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, MCP-1, GM-CSF, interferon typu I, TNF- α i TGF- β), ale po stymulacji bakteriami zaobserwowano tylko wzrost poziomu IL-10 i chemoatraktantu monocytów-1 (MCP-1). Stymulacja iBMDM nietraktowanymi termicznie szczepami BI 7952, Ban 366, Bad 368, Bad 370, Bad 373 i Bin 369 prowadziła do indukcji IL-10 (**Rycina 13A**). Po termicznej inaktywacji zaobserwowano tendencję do spadku poziomu IL-10, ale bez istotności statystycznej. W przypadku poziomu MCP-1, którego główną funkcją w organizmie jest regulacja migracji i aktywacji populacji monocytów i makrofagów (Deshmane et al., 2009) wszystkie nietraktowane szczepy bakterii indukowały znaczący poziom tej chemokiny w porównaniu do kontroli. Tylko w przypadku szczepów BI 7952, Ban 218 i Bad 373 po termicznej inaktywacji dochodzi do prawie całkowitego wyciszenia produkcji tej chemokiny w komórkach iBMDM (**Rycina 13B**). Po stymulacji pozostałymi szczepami zaobserwowano tylko częściowy spadek indukcji MCP-1. Co ciekawe, tylko inaktywowany szczep Bin 369 miał tendencję do indukcji wyższego poziomu tej chemokiny.



Rycina 13 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na linię makrofagów pochodzących ze szpiku kostnego iBMDM. Poziom (A) IL-10, (B) MCP-1 w nadsączach komórek został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 μ g/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie testu t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie $> \#$.

Ostatnią z badanych linii komórek mieloidalnych była linia mysich makrofagów pęcherzykowych wyizolowanych z płuc (MH-S). Analiza stymulacji tej linii wykazała, że po inkubacji ze szczepami *Bifidobacterium* produkuje ona tylko IL-6, TNF- α , a po 72 godzinnej stymulacji GM-CSF (Rycina 14).

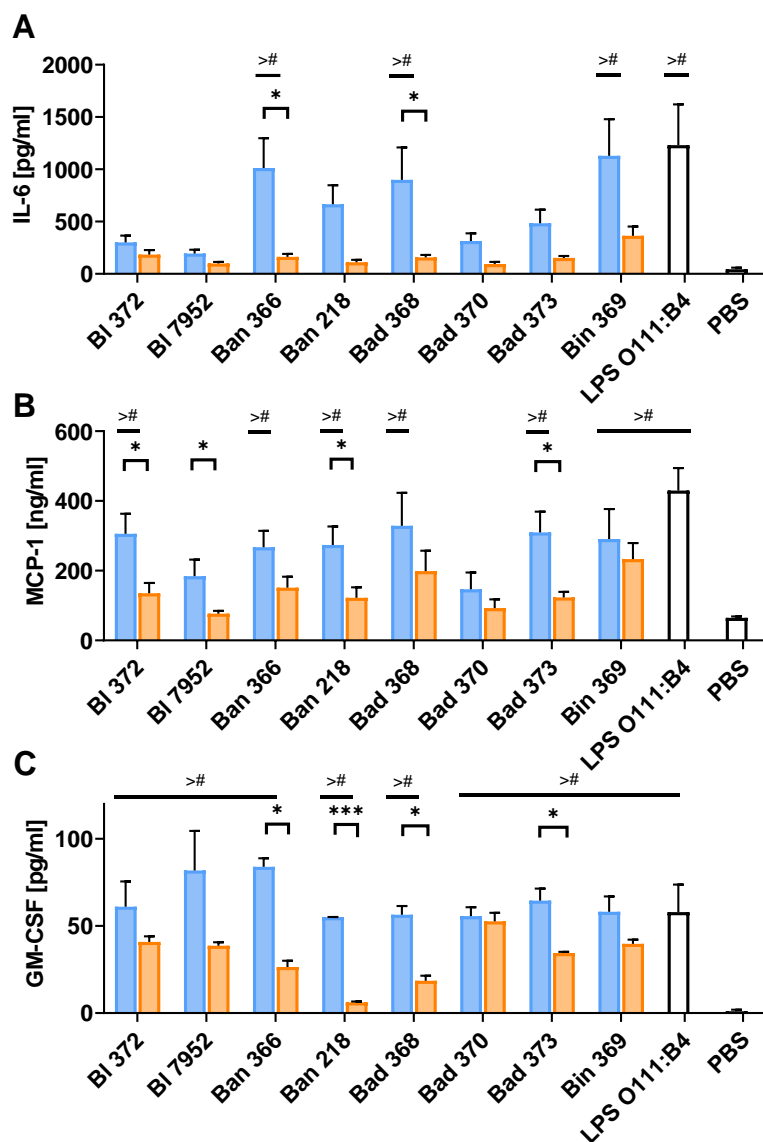


Rycina 14 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na linię makrofagów płucnych MH-S. Poziom (A) IL-6, (B) TNF- α i (C) GM-CSF w nadsączach komórek został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 lub 72 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 μ g/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie $> \#$.

Analiza statystyczna wykazała, że istotny statystycznie poziom indukcji IL-6 zaobserwowano tylko w przypadku stymulacji nietraktowanymi bakteriami Ban 366, Ban 218, Bad 368 i Bin 369 (**Rycina 14A**). Najwyższy poziom TNF- α zaobserwowano po podaniu nietraktowanych Bin 369, Ban 366, Ban 218 i Bad 368. Ponadto termiczna inaktywacja szczepów BI 372, Ban 366 i Bin 369 nie wpłynęła na ich zdolność do indukcji wytwarzania TNF- α przez linię makrofagów MH-S. W przypadku termicznie inaktywowanych szczepów Ban 218 i Bad 368 indukcja TNF- α spada znacząco w porównaniu do nietraktowanych szczepów (**Rycina 14B**). Po 18 godzinnej stymulacji zaobserwowano nieznaczny wzrost poziomu czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), dlatego też cząsteczka ta była oznaczona po 72 godzin stymulacji (**Rycina 14C**). Czynnikiem ten jest odpowiedzialny między innymi za aktywację i migrację komórek szpiku do miejsca infekcji oraz umożliwia zwiększenie przeżywalności komórek w miejscu zapalenia. Ponadto aktywuje eozynofile, neutrofile i bazofile oraz stymuluje ich proliferację (O'Shea et al., 2019). Wyniki wskazują, że tylko nietraktowane szczepy Ban 366, Ban 218, Bad 368 i Bin 369 indukują produkcję GM-CSF, jednak po termicznej inaktywacji zdolność ta spada znacząco i tylko dla szczepu Ban 366 poziom ten nadal pozostaje statystycznie istotny w porównaniu do PBSu.

8.2.2 Pochłanianie bifidobakterii przez komórki nabłonka oraz przekazanie ich komórkom prezentującym antygen

Komórki nabłonka stanowią pierwszą linię kontaktu z bakteriami, dlatego też istotnym było określenie wpływu bifidobakterii na te komórki. W badaniach wykorzystano mysią linię nabłonka płucnego TC-1, w której po 18 godzinnej stymulacji szczepami *Bifidobacterium* i sprawdzono poziomy cytokin szlaków Th1/Th2/T_{reg}. Zaobserwowano, że linia TC-1 produkowała cytokiny takie jak IL-6, MCP-1 i po 72 godzinnej stymulacji GM-CSF (**Rycina 15**).

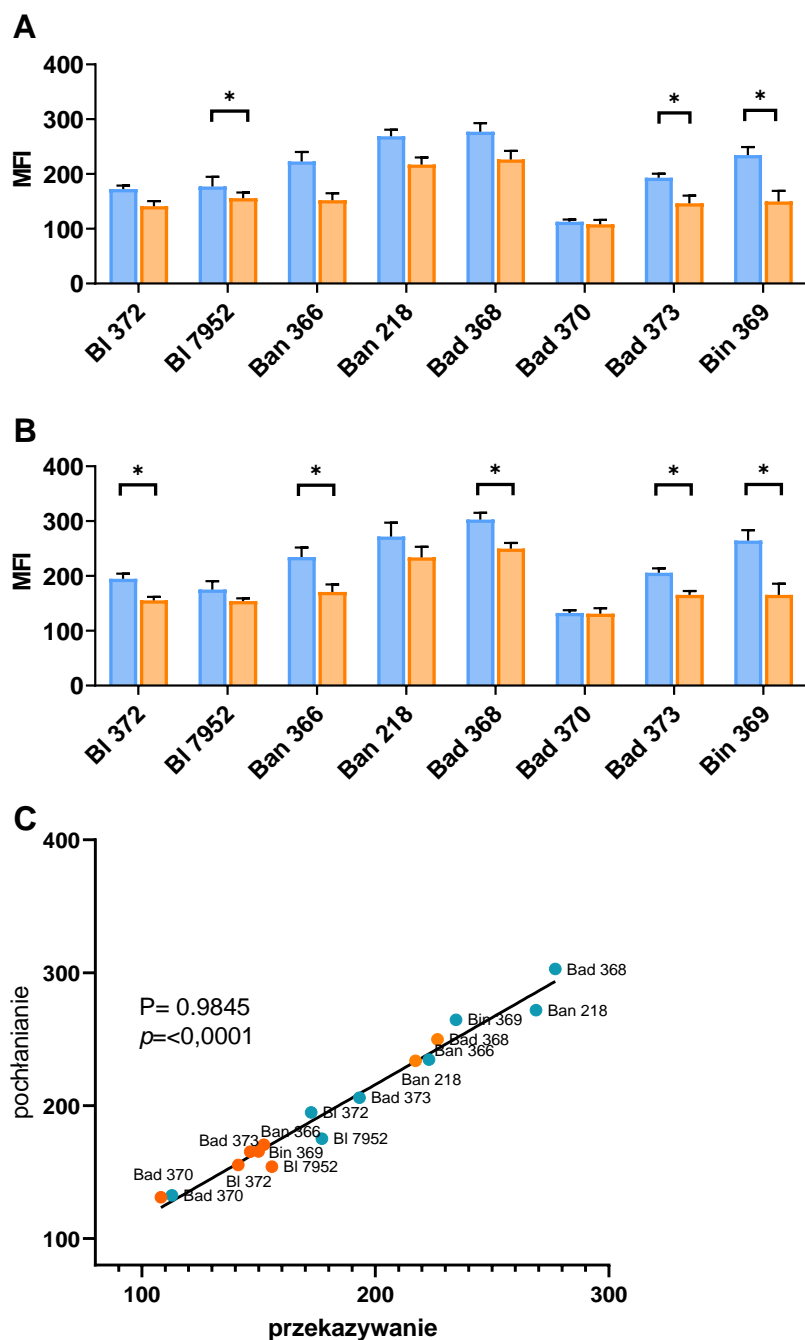


Rycina 15 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na komórki nabłonka płucnego TC-1 w warunkach *in vitro*. Poziom (A) IL-6, (B) MCP-1 i (C) GM-CSF w nadsączach komórkowych linii TC-1 został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 lub 72 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1µg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie >#.

Uzyskane wyniki poziomu IL-6 wskazują, że tylko nietraktowane szczepy Ban 366, Bad 368 i Bad 369 wzbudzają istotną statystycznie produkcję tej cytokiny w komórkach w porównaniu do kontroli (**Rycina 15A**). Po termicznej inaktywacji bakterii dochodzi jednak do znaczącego spadku jej produkcji. Stymulacja nietraktowanymi BI 372, Ban 366, Ban 218, Bad 368, Bad 373 i Bin 369 prowadzi do indukcji MCP-1 przez komórki linii TC-1, podczas gdy stymulacji szczepami BI 7952 i Bad 370 indukuje tylko nieistotny statystycznie poziom tej chemokiny. Termiczna inaktywacja bakterii wpływa na spadek zdolności bifidobakterii do indukcji MCP-1. Tylko w przypadku Bin 369 poziom ten nadal pozostaje istotny statystycznie (**Rycina 15B**). Co ciekawe, w przypadku produkcji GM-CSF wszystkie nietraktowane szczepy bifidobakterii indukowały jego znaczący poziom. Najwyższy poziom GM-CSF zaobserwowano po podaniu nietraktowanych szczepów BI 7952 ($81,846 \pm 32,041$ pg/ml) i Ban 366 ($83,927 \pm 6,962$ pg/ml), a najniższy po podaniu Ban 218 ($55,047 \pm 0,166$ pg/ml) i Bad 370 ($55,641 \pm 7,242$ pg/ml). Termiczna inaktywacja zmniejsza właściwości bakterii do indukcji tej chemokiny u wszystkich szczepów za wyjątkiem szczepu Bad 370. W przypadku szczepów Ban 366, Bad 218, Bad 368 i Bad 373 spadek ten jest istotny statystycznie. U Ban 366, Bad 218, Bad 368 po inaktywacji przestaje on być istotny statystycznie w porównaniu do kontroli (**Rycina 15C**).

Kolejnym etapem badań *in vitro* było określenie zdolności komórek nabłonkowych do pochłaniania bifidobakterii. Po inkubacji komórek nabłonkowych z bakteriami wybarwionymi uprzednio SYTO9TM, zbadano jaka część komórek TC-1 pochłonięła bakterie. Wyniki oparto o wartości średniej intensywności fluorescencji (MFI) w zakresie światła zielonego. Bakterie, które zostały pochłonięte w największej ilości należały do nietraktowanych szczepów Ban 218 i Bad 368. Z kolei szczep Bad 370 został pochłonięty najslabiej. Termiczna inaktywacja marginalnie wpłynęła na spadek pochłaniania bakterii przez komórki nabłonka. Tylko w przypadku BI 7952, Bad 373 i Bin 369 stopień pochłonięcia uległ statystycznie istotnemu spadkowi (**Rycina 16A**).

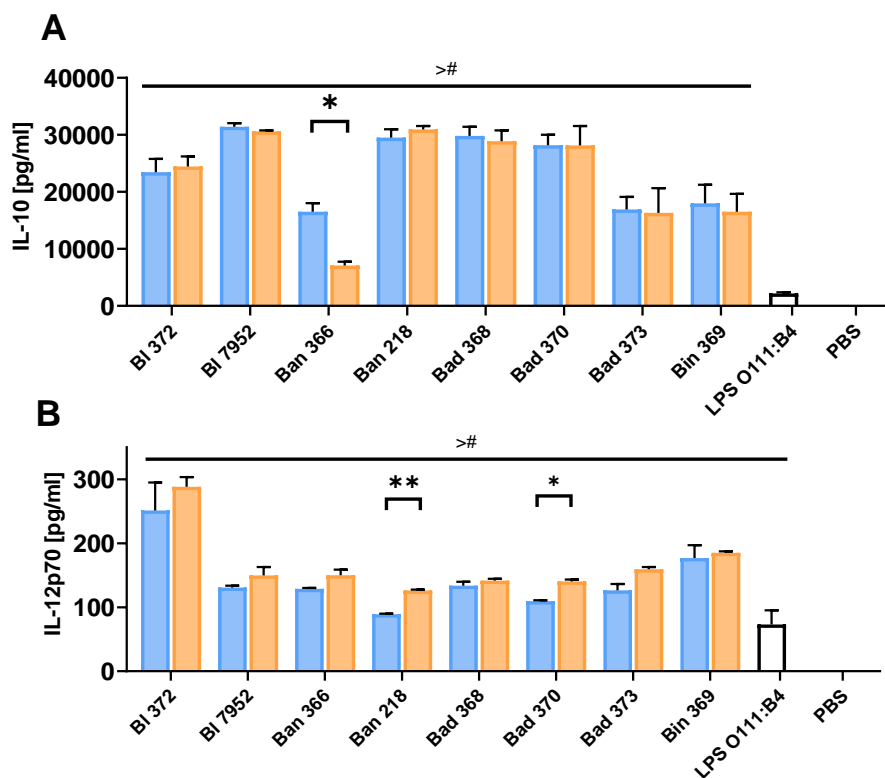
Następnie przebadano jak nietraktowane i termicznie inaktywowane bakterie są przekazywane pomiędzy komórkami nabłonka, a komórkami dendrytycznymi JAWS II. Wyniki wskazują, że nietraktowane bakterie, które zostały pochłonięte przez linię TC-1 są przekazywane w większym stopniu niż inaktywowane. U wszystkich termicznie inaktywowanych szczepów za wyjątkiem Bad 370 widać, że wartość MFI jest niższa niż nietraktowanych bakterii, jednak tylko w przypadku BI 372, Ban 366, Bad 368, Bad 373 i Bin 369 jest ona istotna statystycznie (**Rycina 16B**). Badanie korelacji jakie zachodzą pomiędzy wartościami MFI pochłoniętych bakterii, a następnie przekazanych komórkom dendrytycznym wskazuje, że za wyjątkiem szczepu Bad 370 komórki pochłaniają i przekazują znacznie lepiej nietraktowane bakterie (**Rycina 16C**). Widać to wyraźnie na przykładzie Ban 368 i Bin 369, gdzie po obróbce termicznej obserwuje się znaczny spadek wartości MFI zarówno w badaniu pochłaniania jaki i przekazywania.



Rycina 16 Pochłanianie bifidobakterii na komórki nabłonka, a następnie ich transfer do komórek immunologicznych. (A) Pochłanianie nietraktowanych (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanych (pomarańczowe słupki) komórek bakteryjnych przez komórki linii nabłonka płucnego TC-1 i (B) transfer komórek pochłoniętych przez komórkami nabłonka, do komórek dendrytycznych JAWS II, (C) badanie korelacji Pearsona pomiędzy przekazywaniem i pochłanianiem bakterii. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * $p < 0,05$.

Następnie określono właściwości modulatorowe szczepów bifidobakterii z wykorzystaniem komórek rozpoznających antygen. W pierwszej kolejności sprawdzono odpowiedź linii komórek dendrytycznych JAWS II, jednak stymulacja badanymi szczepami

(oraz LPS) nie doprowadziła do indukcji produkcji żadnych badanych przez nas cytokin/chemokin (dane nie pokazane). Następnie eksperymenty przeprowadzono na komórkach dendrytycznych wyizolowanych ze szpiku kostnego myszy (BMDC). W badaniach skupiono się przede wszystkim na ocenie możliwości badanych bakterii do indukcji wytwarzania IL-10 i IL-12p70 (**Rycina 17**).



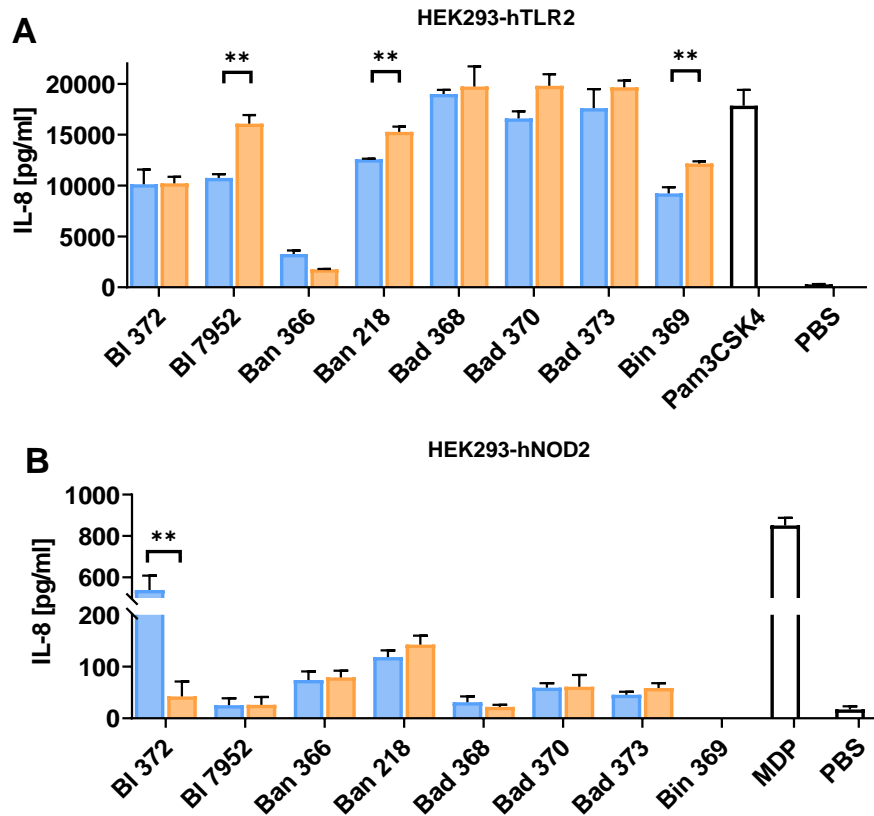
Rycina 17 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na komórki prezentujące antygen w warunkach *in vitro*. Poziom (A) IL-10 i (B) IL-12p70 w nadśączkach komórkowych komórek dendrytycznych BMDC został zmierzony za pomocą testu ELISA po 20 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1µg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie >#.

Komórki dendrytyczne wyizolowano i zróżnicowano zgodnie z opisem umieszczonym w Materiałach i Metodach 7.6, stymulowano nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami przez 20 godzin, a następnie zmierzono poziom cytokin w nadśączkach znad hodowli. Wyniki wskazują, że wszystkie badane szczepy stymulują produkcję obu tych cytokin. Najwyższy poziom IL-10 zaobserwowano po stymulacji szczepami BI 7952 (31404 ± 636 pg/ml) i Bad 368 (29821 ± 1583 pg/ml). Z kolei najniższy w przypadku Ban 366 (16527 ± 1484 pg/ml) i Bad 373 (16929 ± 2189 pg/ml). Nie zaobserwowano znaczących różnic w poziomach pomiędzy nietraktowanymi, a termicznie inaktywowanymi bakteriami za wyjątkiem szczepu Ban 366, gdzie termiczna inaktywacja bakterii skutkowałą znaczącym spadkiem indukcji produkcji IL-10

w porównaniu do nietraktowanych bakterii (**Rycina 17A**). Najwyższy poziom IL-12p70 uzyskano po stymulacji B1 372. Co ciekawe termiczna inaktywacja szczepów nieznacznie podwyższyła zdolność bakterii do indukcji tej cytokiny. Zauważalne jest to zwłaszcza u szczepów Ban 218 i Bad 370 (**Rycina 17B**).

8.2.3 Badanie roli receptorów TLR i NOD w rozpoznawaniu bifidobakterii

W nadsączach hodowli ludzkich komórek HEK293, którym stabilnie wprowadzono geny kodujące ludzki receptory hTLR2, hTLR4, hNOD2 i hNOD1 stymulowanych szczepami bifidobakterii w stężeniu 10^7 CFU, oznaczono poziom IL-8. W przypadku aktywacji receptorów hTLR4 i hNOD1 przez bifidobakterie poziom IL-8 był niewykrywalny, co świadczy o tym, że te receptory nie biorą udziału w rozpoznawaniu bakterii (dane nie pokazane). Szczepy bifidobakterii są rozpoznawane głównie przez receptor hTLR2. Najwyższy poziom IL-8 zaobserwowano dla bakterii *Bifidobacterium adolescentis* (Bad 368, Bad 370 i Bad 373) co świadczy o najlepszym rozpoznawaniu przez receptor. Z kolei najniższy poziom zaobserwowano po stymulacji Ban 366. Termiczna inaktywacja u większości szczepów nie powoduje zmian w rozpoznawaniu antygenów bakteryjnych przez receptor TLR2. Tylko w przypadku szczepów B1 7952, Ban 218 i Bin 369 widać, że inaktywowane termicznie bakterie indukują wyższy poziom IL-8 niż nietraktowane bakterie (**Rycina 18A**). W przypadku receptora NOD2 analiza statystyczna wykazała, że tylko dwa szczepy (B1 372 i Ban 218) są rozpoznawane przez ten receptor. Po inaktywacji termicznej możliwość rozpoznawania bakterii B1 372 znacznie spada. W przypadku Ban 218 zaobserwowano z kolei, że inaktywacja umożliwia wydajniejsze rozpoznawanie bakterii przez ten receptor (**Rycina 18B**).

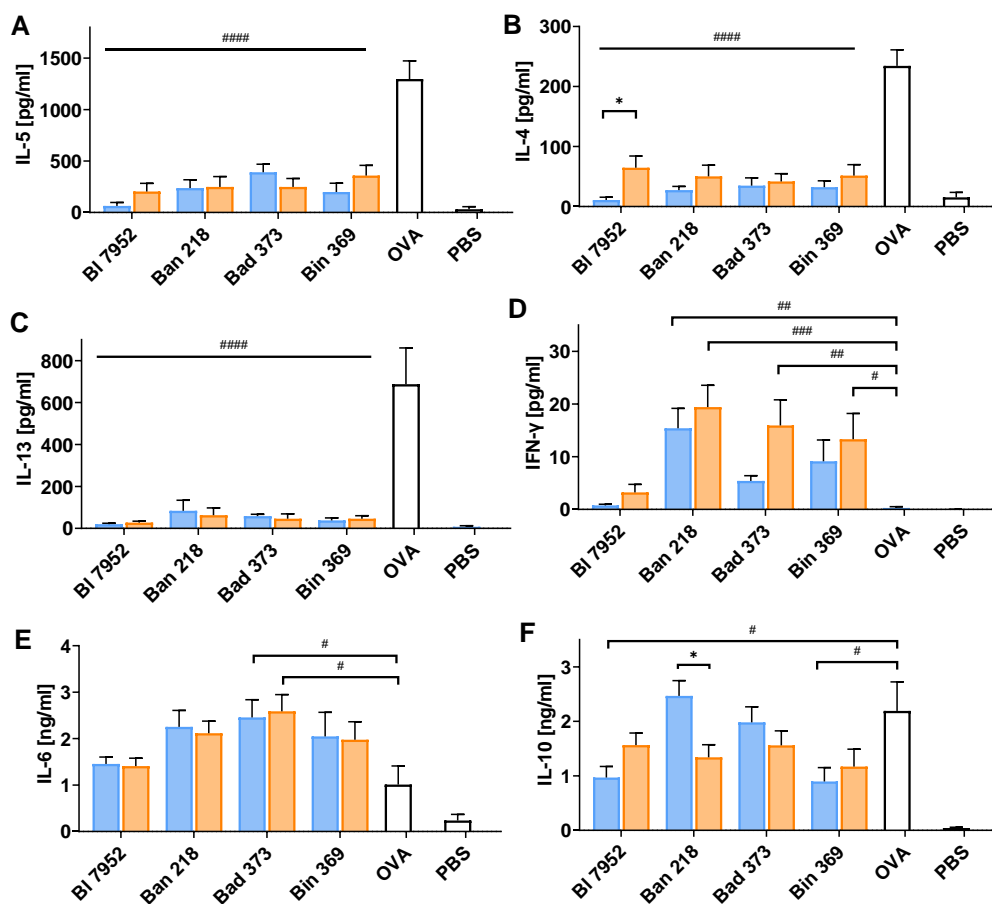


Rycina 18 Wpływ podania bifidobakterii na aktywację receptorów hTLR2 i hNOD2. Poziom cytokiny IL-8 posłużył jako wskaźnik aktywacji receptorów. Komórki stymulowano nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami przez 16 godzin. Jako kontrole pozytywne zastosowano ligand TLR2 Pam3CSK4 (1 μ g/ml) i ligand NOD2 dipeptyd muramyłowy (MDP; 100 ng/ml), PBS został wykorzystany jako kontrola negatywna. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * * $p < 0,01$.

Wykonane badania pozwoliły na ocenę specyficznych właściwości immunomodulujących 8 szczepów *Bifidobacterium*. Wszystkie badane szczepy zarówno w komórkach immunologicznych jak i nabłonkowych indukowały odpowiedź immunomodulującą i pozwoliły na opracowanie profilów cytokinowych. Ponadto wykazano, że termiczna inaktywacja wpływa na właściwości modulujące badanych w pracy szczepów. W dalszych etapach pracy skupiono się na badaniu *in vitro* 4 szczepów (BI 7952, Ban 218, Bad 373 i Bin 369) ze względu na ich zróżnicowaną odpowiedź immunomodulującą.

8.3 PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOMODULUJĄCYCH WYBRANYCH SZCZEPÓW *BIFIDOBACTERIUM* Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK ŚLEDZIONY WYZIŁOWANYCH Z MYSZY UWRAŻLIWIONYCH NA OVA

Z myszy BALB/c uprzednio uwrażliwionych na owoalbuminę wyizolowano splenocyty (rozdział Materiały i Metody 7.6), które następnie re-stymulowano OVA oraz bakteriami przez 72 godziny. W nadsączach hodowli splenocytów oznaczono cytokiny szlaków Th1/Th2. Kontrolą negatywną były komórki stymulowane PBSem, a pozytywną komórki re-stymulowane tylko OVA. Re-stymulacja splenocytów samą OVA spowodowała wzrost poziomu cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi Th2, takich jak IL-4, IL-5 i IL-13 (**Rycina 19A, B i C**), IL-10 (**Rycina 19F**) oraz IL-6 (**Rycina 19E**) w stosunku do niestymulowanych komórek. Nie zaobserwowano produkcji IFN- γ (**Rycina 19D**), głównej cytokiny szlaku Th1.



Rycina 19 Nietraktowane i termicznie inaktywowane szczepy bifidobakterii wpływają na produkcję cytokin indukowanych podaniem OVA w hodowlach splenocytów pobranych z myszy uwrażliwionych na OVA. Poziom cytokin (A) IL-5, (B) IL-4, (C) IL-13, (D) IFN- γ , (E) IL-6 i (F) IL-10 oznaczono po 72 godzinnej stymulacji OVA oraz nietraktowanymi (niebieskie słupki) lub termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Komórki stymulowane PBS posłużyły jako kontrola negatywna. Poziom cytokin oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Wartości zebrano z dwóch niezależnych eksperymentów. Różnice między nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami zbadano za pomocą testu t-Studenta (* $p < 0.05$). Porównanie między grupą, której podano tylko OVA, a grupami z OVA i bakteriami przebadano za pomocą testu ANOVA Dunett'a # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$.

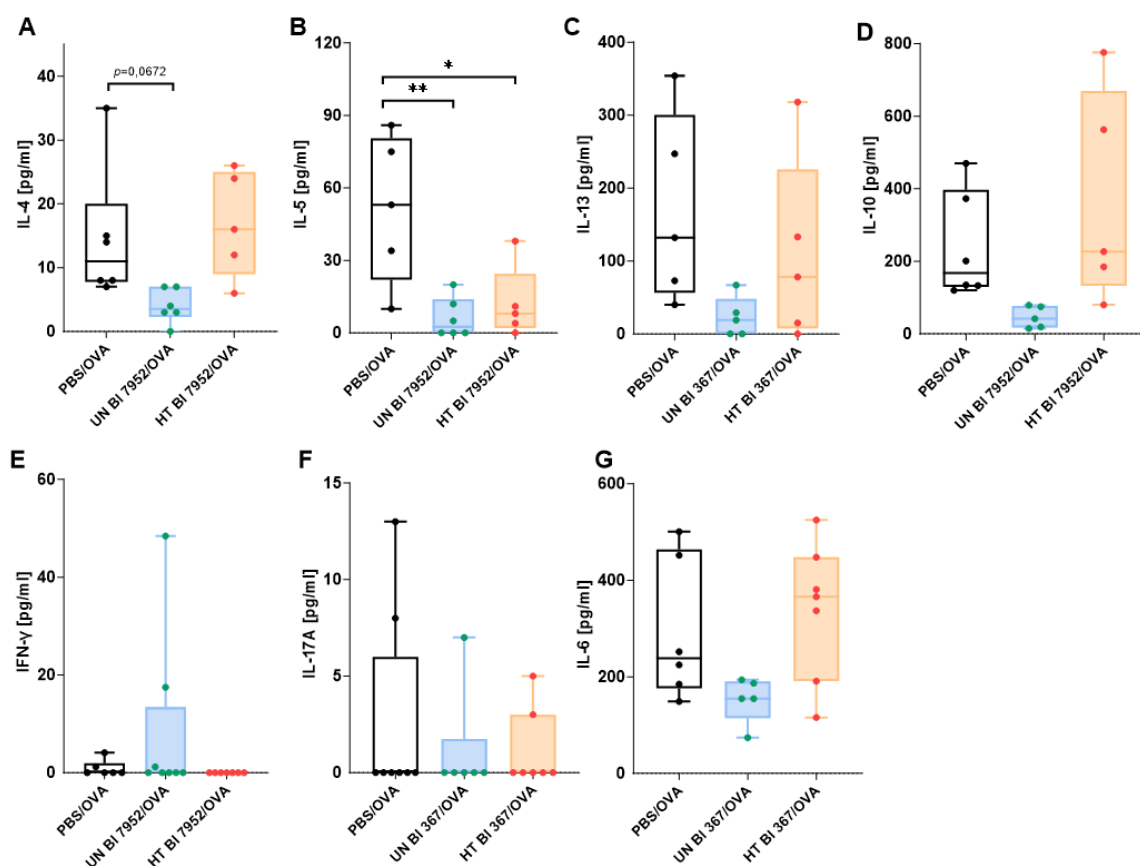
Wszystkie badane szczepy bifidobakterii hamują produkcję cytokin szlaku Th2. Nie zaobserwowano by inaktywacja termiczna wpłynęła na poziom tych cytokin. Jedynym wyjątkiem jest tu szczep BI 7952, gdzie traktowanie komórek wysoką temperaturą wpływa na słabszą supresję IL-4 w porównaniu do nietraktowanych komórek (**Rycina 19B**). Szczep ten jako jedyny nie aktywował produkcji IFN- γ . Ban 218 podany niezależnie czy jako nietraktowane, czy inaktywowane bakterie spowodował znaczący wzrost interferonu. Z kolei w przypadku Bad 373 i Bin 369 tylko termicznie inaktywowane bakterie indukowały wzrost poziomu tej cytokiny (**Rycina 19D**). W przypadku IL-6, tylko stymulacja szczepem Bad 373 prowadziła do wzrostu poziomu tej cytokiny (**Rycina 19E**). Stymulacja nietraktowanymi szczepami BI 7952 i Bin 369 hamuje indukcję produkcji IL-10 wywołanej OVA, jednakże potraktowanie szczepów wysoką temperaturą znosi ten efekt (**Rycina 19F**).

Uzyskane wyniki wskazują, że szczep BI 7952 hamuje odpowiedź szlaku Th2 indukowaną podaniem OVA w mysich komórkach śledziony, równocześnie jako jedyny nie wzbudził odpowiedzi Th1. Może to sugerować, że indukuje on inną ścieżkę odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na alergen. Ponadto wcześniejsze badania dotyczące tego szczepu wykazały, że zapobiega on uwrażliwieniu myszy na alergeny pyłku brzozy Bet v1 w modelu myszy gnotobiotycznych, które były mono kolonizowane tym szczepem (Schwarzer et al., 2013). Na podstawie tych informacji, szczep BI 7952 został wybrany do dalszych eksperymentów *in vivo*.

8.4 DONOSOWE PODAWANIE NIETRAKTOWANEGO I TERMICZNIE INAKTYWOWANEGO BI 7952 OSŁABIA HUMORALNĄ I KOMÓRKOWĄ ODPOWIEŹ IMMUNOLOGICZNĄ W MYSIM MODELU ALERGII WYWOŁANEJ PODANIEM OVA

Charakterystykę właściwości przeciwalergicznych szczepu BI 7952 wykonano w mysim modelu alergii wziewnej na OVA opisanym w rozdziale Materiały i Metody punkt 7.7. W pierwszej kolejności przebadano czy pobrane splenocyty od myszy traktowanych bakteriami i OVA, po re-stymulacji OVA będą produkowały cytokiny szlaków Th1/Th2. Grupę myszy, która przyjmowała nietraktowany szczep BI 7952 oznaczono jako UN BI 7952/OVA, a termicznie inaktywowane bakterii HT BI 7952/OVA. Grupa kontrolna została opisana jako PBS/OVA. Myszy, które przyjmowały nietraktowane bakterie BI 7952 mają obniżony poziom cytokin szlaku Th2 tj. IL-5, IL-4 i IL-13 (**Rycina 20A, B i C**) w porównaniu do grupy PBS/OVA. Po podaniu myszom inaktywowanych termicznie bakterii obniżeniu ulegał tylko poziom IL-5. W przypadku IL-10 i IL-6 (**Rycina 20D i G**) obserwuje się trend, w którym widać, że podanie donosowe myszom nietraktowanych bakterii wpływa na zmniejszenie produkcji obu tych cytokin w splenocytach, podczas gdy podanie inaktywowanych bakterii nie ma wpływu na ich poziom w porównaniu do

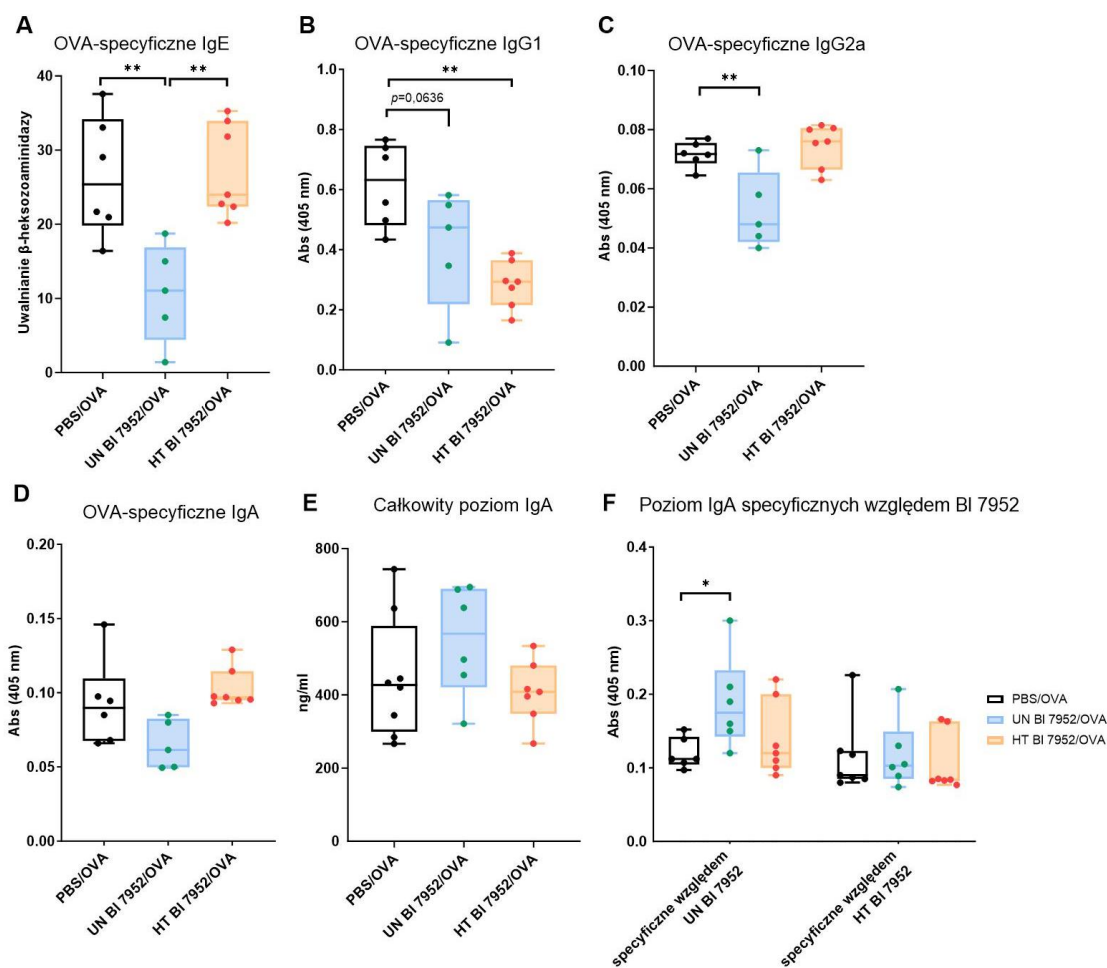
grupy PBS/OVA. W przypadku IFN- γ i IL-17A (**Rycina 20E i F**) ich produkcja w splenocytach jest znikoma, a ponadto nie obserwowano istotnie statystycznych zmian w obrębie badanych grup.



Rycina 20 Donosowe podanie nietraktowanych i termicznie inaktywowanych bakterii BI 7952 osłabia odpowiedź immunologiczną wywołaną przez owoalbuminę. Poziom cytokin (A) IL-5, (B) IL-4, (C) IL-13, (D) IFN- γ , (E) IL-6 i (F) IL-10 oznaczono po 72 godzinnej stymulacji OVA w grupach myszy przyjmujących nietraktowane (UN BI 7952/OVA, niebieskie słupki), inaktywowane (HT BI 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterie lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki). Poziom cytokin oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Na podstawie poziomu przeciwciał oszacowano również obwodową odpowiedź organizmu. W surowicy krwi oznaczono poziom przeciwciał IgE, IgG1, IgG2a i IgA (**Rycina 21**). Oznaczenie poziomu OVA-specyficznych IgE przy wykorzystaniu komórek RBL-2H3 wskazuje, że tylko podanie nietraktowanych BI 7952 (UN BI 7952/OVA) skutkuje statystycznie istotnym obniżeniem poziomu tych przeciwciał w porównaniu do grupy PBS/OVA (**Rycina 21A**). Podobnemu spadkowi ulega poziom OVA-specyficznych przeciwciał IgG2a, który to powiązane są z aktywacją szlaku Th1 (**Rycina 21C**). Z kolei poziom OVA-specyficznych przeciwciał IgG1 był obniżony w obu badanych grupach w porównaniu do grupy kontrolnej (**Rycina 21B**). Zarówno w przypadku UN BI 7952/OVA jak i HT BI 7952/OVA nie obserwuje się statystycznie istotnych zmian w poziomach całkowitych i OVA-specyficznych przeciwciał IgA (**Rycina 21D i E**).

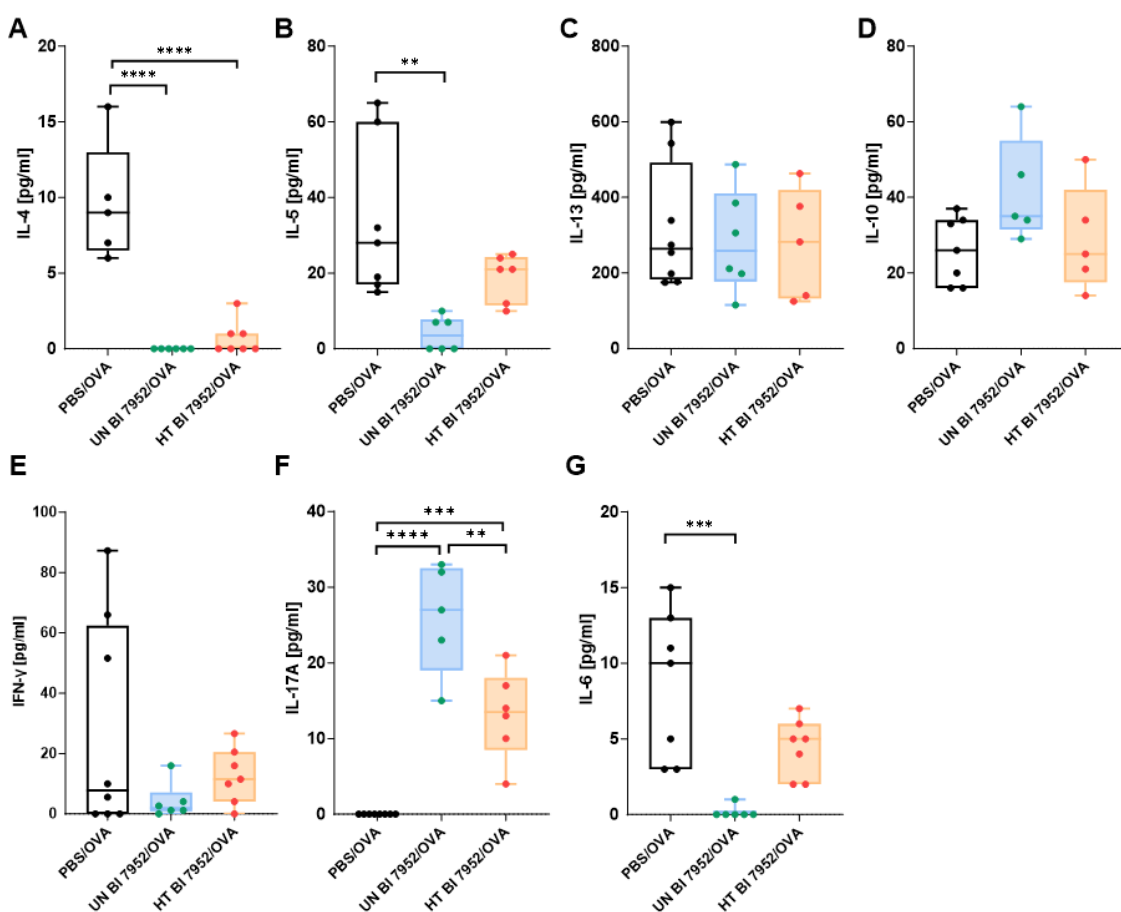
Dodatkowo zbadano poziom przeciwciał IgA skierowanych specyficznie przeciwko bakteriom. Wyniki wskazują, że tylko w grupie UN BI 7952/OVA dochodzi do powstawania specyficznych przeciwciał IgA skierowanych przeciw nietraktowanym BI 7952. Z kolei w grupie, która przyjmowała termicznie inaktywowane BI 7952 nie obserwuje się zmian w poziomie tego rodzaju przeciwciał w porównaniu do grupy PBS/OVA (**Rycina 21F**).



Rycina 21 Donosowe podanie nietraktowanych i termicznie inaktywowanych bakterii BI 7952 wpływa na produkcję przeciwciał w mysim modelu uczulenia na OVA. Oznaczono poziom przeciwciał skierowanych przeciwko OVA: (A) IgE, (B) IgG1, (C) IgG2 i (D) IgA, (E) całkowity poziom IgA, oraz (F) specyficznych IgA skierowanych przeciw BI 7952. Wpływ nietraktowanych (UN BI 7952/OVA, niebieskie słupki), inaktywowanych (HT BI 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterii lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki) określono na podstawie poziomu przeciwciał znajdujących się w surowicy krwi obwodowej. Do oznaczenia poziomów przeciwciał próbki rozcieńczono 1:810 dla komórek RBL, 1:10 000 dla IgG1, 1:100 dla IgG2a 1:10 dla IgA. Do oznaczenia poziomu przeciwciał IgA specyficznych względem nietraktowanych (UN) i termicznie inaktywowanych (HT) BI 7952 surowicę rozcieńczono dwukrotnie. Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

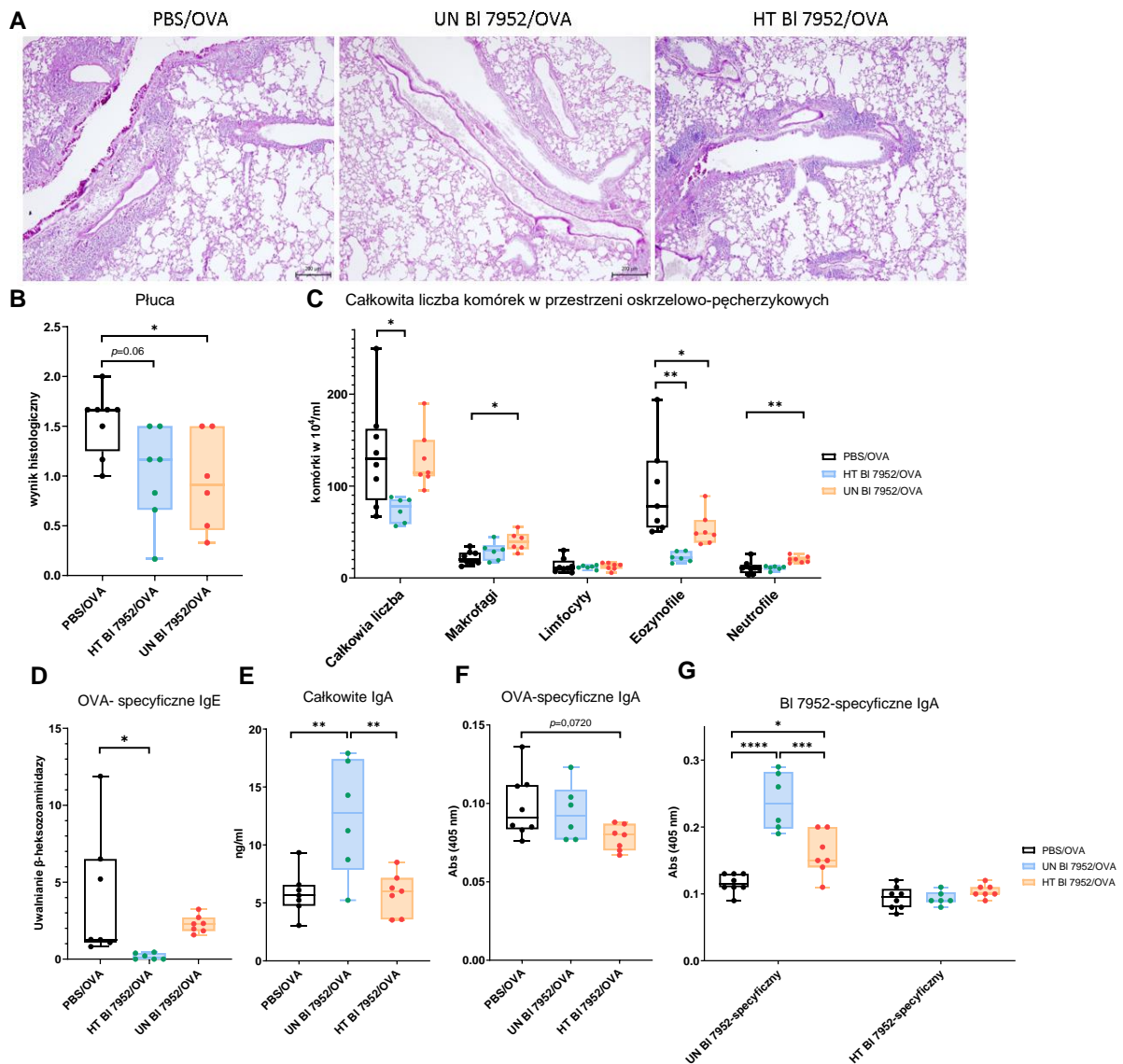
Badanie poziomu cytokin w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym (BALF) wykazało, że podanie myszom donosowo nietraktowanych BI 7952 (UN BI 7952/OVA) skutkuje spadkiem poziomu IL-4 i IL-5, jednak nie wpływa na poziom IL-13 (**Rycina 22 A, B i C**). W grupie

HT BI 7952/OVA obserwowany jest tylko spadek poziomu IL-4. U myszy z grupy UN BI 7952 zaobserwowano również, że poziom IL-6 jest znacząco niższy niż u myszy PBS/OVA, a w przypadku grupy HT BI 7952/OVA poziom ten również jest niższy, choć nie istotny statystycznie (**Rycina 22G**). Podanie szczepu BI 7952 zarówno jako nietraktowanych jak i termicznie inaktywowanych indukuje produkcję tej IL-17A w płucach. W przypadku UN BI 7952/OVA poziom ten sięga prawie 30 pg/ml i jest znacząco wyższy niż w grupie PBS/OVA (**Rycina 22F**). W przypadku IL-10 pomimo, że nie obserwuje się różnic pomiędzy grupami, można w przypadku UN BI 7952 stwierdzić tendencję do wzrostu poziomu tej cytokiny (**Rycina 22D**). W przypadku IFN- γ nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie między badanymi grupami (**Rycina 22E**).



Rycina 22 Donosowe podawanie nietraktowanego i termicznie inaktywowanego BI 7952 moduluje profil cytokinowy w alergicznym zapaleniu płuc myszy uczulonych na OVA. Wpływ nietraktowanych (UN BI 7952/OVA, niebieskie słupki), inaktywowanych (HT BI 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterii lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki) określono na podstawie poziomu cytokin w płynie oskrzelowo- pęcherzykowym. Poziom cytokin oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnnett *p < 0,05. **p < 0,01.

1 Analiza histologiczna skrawków płuc ujawniła, że w przypadku obu grup przyjmujących
2 BI 7952 zaobserwowano zmniejszenie nacieków komórkowych oraz mniejszą ilość komórek
3 produkujących śluz niż w grupie PBS/OVA. Ponadto w obu grupach (UN BI 7952/OVA i HT
4 BI 7952/OVA) widoczne jest zmniejszenie zapalenia okołonaczyniowego i okołoskrzelowego.
5 Można również zauważyć niższą obecność ilości leukocytów w przestrzeniach pęcherzykowych
6 (**Rycina 23A i B**). W BALF grupy UN BI7952/OVA zidentyfikowano znacząco niższą ilość
7 komórek immunologicznych w porównaniu do grupy kontrolnej. Obserwowano znaczący spadek
8 liczby eozynofili. W przypadku pozostałych grup komórek nie zauważono różnic pomiędzy
9 UN BI7952/OVA, a grupą PBS/OVA. Co ciekawe pomimo braku różnic w ogólnej licznie komórek
10 immunologicznych między grupą HT BI 7952/OVA, a grupą kontrolną zaobserwowano znaczący
11 wzrost liczby makrofagów i neutrofilów w grupie przyjmującej termicznie inaktywowane bakterie.
12 Brak różnic można wytłumaczyć równoczesnym spadkiem ilości eozynofili w badanej grupie
13 (**Rycina 23C**). W BALF grupy UN BI7952/OVA zidentyfikowano znacząco niższą ilość komórek
14 immunologicznych w porównaniu do grupy kontrolnej, które jak wykazała dalsza analiza okazały
15 się eozynofilami. W przypadku pozostałych grup komórek nie zauważono różnic pomiędzy
16 UN BI7952/OVA, a grupą PBS/OVA. Co ciekawe pomimo braku różnic w ogólnej licznie komórek
17 immunologicznych między grupą HT BI 7952/OVA, a grupą kontrolną zaobserwowano znaczący
18 wzrost liczby makrofagów i neutrofilów w grupie przyjmującej termicznie inaktywowane bakterie.
19 Brak różnic można wytłumaczyć równoczesnym spadkiem ilości eozynofili w badanej grupie
20 (**Rycina 23C**). Następnie zbadano poziom przeciwciał IgE specyficznych względem OVA
21 wykorzystując komórki linii RBL, dla których oznaczono poziom uwolnienia β -heksozaminidazy.
22 Wykazano, że tylko po podaniu nietraktowanych BI 7952 poziom IgE znacząco spada (**Rycina**
23 **23D**). W BALF zaobserwowano znacząco większy poziom całkowitych przeciwciał IgA u myszy
24 przyjmujących nietraktowany BI 7952 w porównaniu do grup PBS/OVA i HT BI 7952/OVA
25 (**Rycina 23E**). Co ciekawe poziom przeciwciał IgA skierowanych przeciwko OVA w tej grupie nie
26 uległ zmianie. Jedynie w grupie HT BI 7952/OVA można zaobserwować pewną tendencję
27 spadkową (**Rycina 23F**). Największą różnicę w poziomach przeciwciał IgA zaobserwowano
28 w grupie przeciwciał skierowanych przeciwko podawanym donosowo bakteriom. W grupie myszy
29 przyjmującej nietraktowane bakterie (UN BI 7952/OVA) widać, że doszło to wytworzenia
30 przeciwciał IgA rozpoznających nietraktowane bakterie. Podobne wyniki uzyskano wykorzystując
31 surowicę krwi z grupy HT BI 7952. Jednakże, nie zaobserwowano obecności specyficznych
32 przeciwciał IgA w układzie homologicznym tzn. przeciw bakteriom termicznie inaktywowanym
33 (**Rycina 23G**).



Rycina 23 Donosowe podawanie nietraktowanego i termicznie inaktywowanego BI 7952 w różny sposób zmniejsza zapalenie alergiczne w płucach myszy uczulonych na OVA. (A) Zbadano skrawki tkanki płucnej barwione kwasem nadjodowym-Schiffa myszy, które przyjmowały nietraktowane (UN BI 7952/OVA, niebieskie słupki) i inaktywowane (HT BI 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterie lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki). (B) Próbkę została poddana ocenie histopatologicznej przez dwóch niezależnych ekspertów. (C) Zliczono całkowitą ilość komórek immunologicznych obecnych w BALF. (D, E, F i G) Określono poziomy przeciwciał znajdujących się w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym. Do oznaczenia poziomów przeciwciał próbki nie rozcieńczano dla komórek RBL i nierozcieńczonych dla IgA. Do oznaczenia poziomu przeciwciał IgA specyficznych względem nietraktowanych (UN) i termicznie inaktywowanych (HT) BI 7952 BALF rozcieńczono dwukrotnie. Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

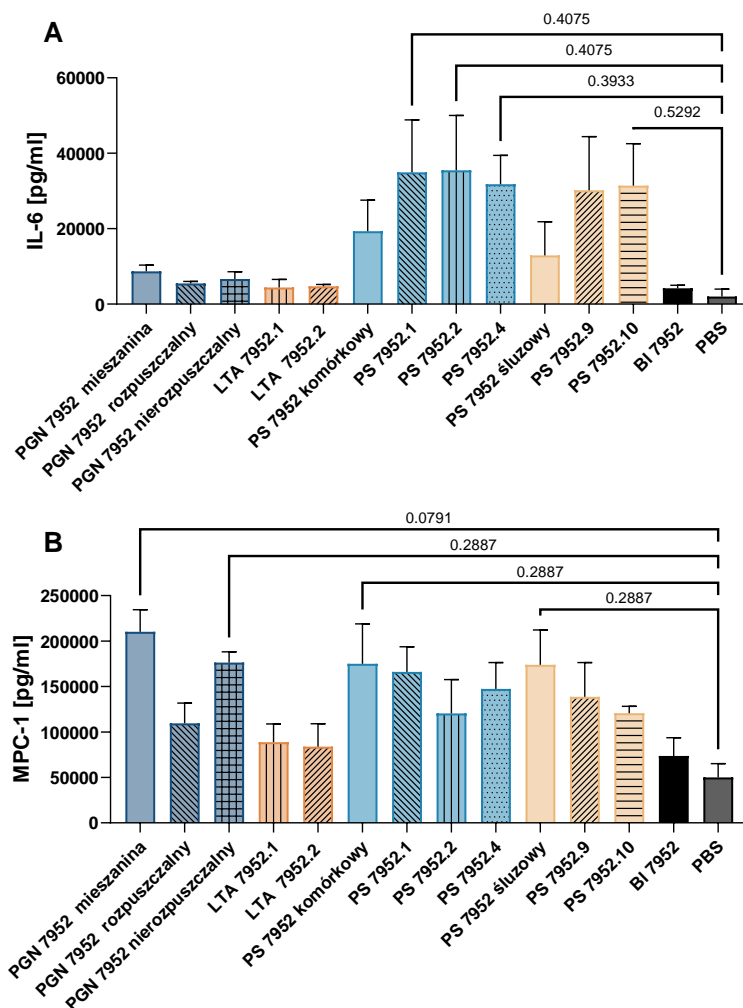
Przeprowadzone badania na mysim modelu alergii indukowanej OVA wykazały, że nietraktowany (podany jako żywy) szczep BI 7952 podawany donosowo chroni przed rozwojem alergii, zarówno działając lokalnie (płuca) jak i systemowo. Zaobserwowano, że szczep ten oprócz hamowania produkcji cytokin szlaku Th2 nie indukuje aktywacji szlaku Th1 (brak indukcji

IFN - γ). Nie zaobserwowano zmian w poziomie IL-10, co może wskazać, że nie dochodzi do uruchomienia szlaku T_{reg} . Oznaczono jednak wzrost IL-17A, która jest jedną z głównych cytokin szlaku Th17. Wyniki wskazują, że termiczna inaktywacja skutkuje częściową utratą właściwości immunomodulujących, skutkując zmniejszeniem zdolności do modulowania odpowiedzi immunologicznej w reakcji alergicznej. W dalszej części pracy postawiono sobie pytanie, jakie antygeny powierzchniowe mogą być odpowiedzialne za obserwowane właściwości immunomodulujące.

8.5 ANTYGENY POWIERZCHNIOWE BL 7952 W ZRÓŻNICOWANYM SPOSÓB WPLYWAJĄ NA ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNĄ

Kolejnym celem pracy była charakterystyka wybranych antygenów powierzchniowych szczepu Bl 7952. Antygenami wyizolowanymi w trakcie wykonywania niniejszych badań był peptydoglikan (PGN), którego izolację i oczyszczanie opisano w rozdziale Materiały i metody punkt 7.8.1. W badaniach skupiono się na 3 próbkach peptydoglikanowych: frakcji mieszanej, rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej. W literaturze najczęściej wykorzystuje się wyłączenie frakcję rozpuszczalną peptydoglikanu, jednak w niniejszej pracy sprawdzono właściwości immunomodulujące obu (Porfírio et al., 2019). Wyizolowany lecz nadal stanowiący mieszaninę LTA rozdzielono na kolumnach chromatograficznych tak jak opisano to rozdziale Materiały i metody punkt 7.8.2. Za pomocą testu kolorymetrycznego zidentyfikowano dwie frakcje różniące się właściwościami hydrofobowymi: LTA 7952.1 był cząsteczką mniej hydrofobową niż LTA 7952.2. Ostatnią grupą badanych antygenów były polisacharydy, które zostały wyizolowane ze ściany komórkowej oraz śluzu bakteryjnego zgodnie z opisem w rozdziale Materiały i metody 7.8.3. Mieszaninę polisacharydów oczyszczono następnie za pomocą chromatografii kolumnowej (Materiały i metody punkt 7.8.3.1). Po rozdziale na dwóch kolumnach chromatograficznych frakcje zidentyfikowano za pomocą testu DuBois uzyskując kilka frakcji różniących się masą i ładunkiem. Po sprawdzeniu frakcji na NMR wybrano cztery, które zawierały czyste związki polisacharydowe.

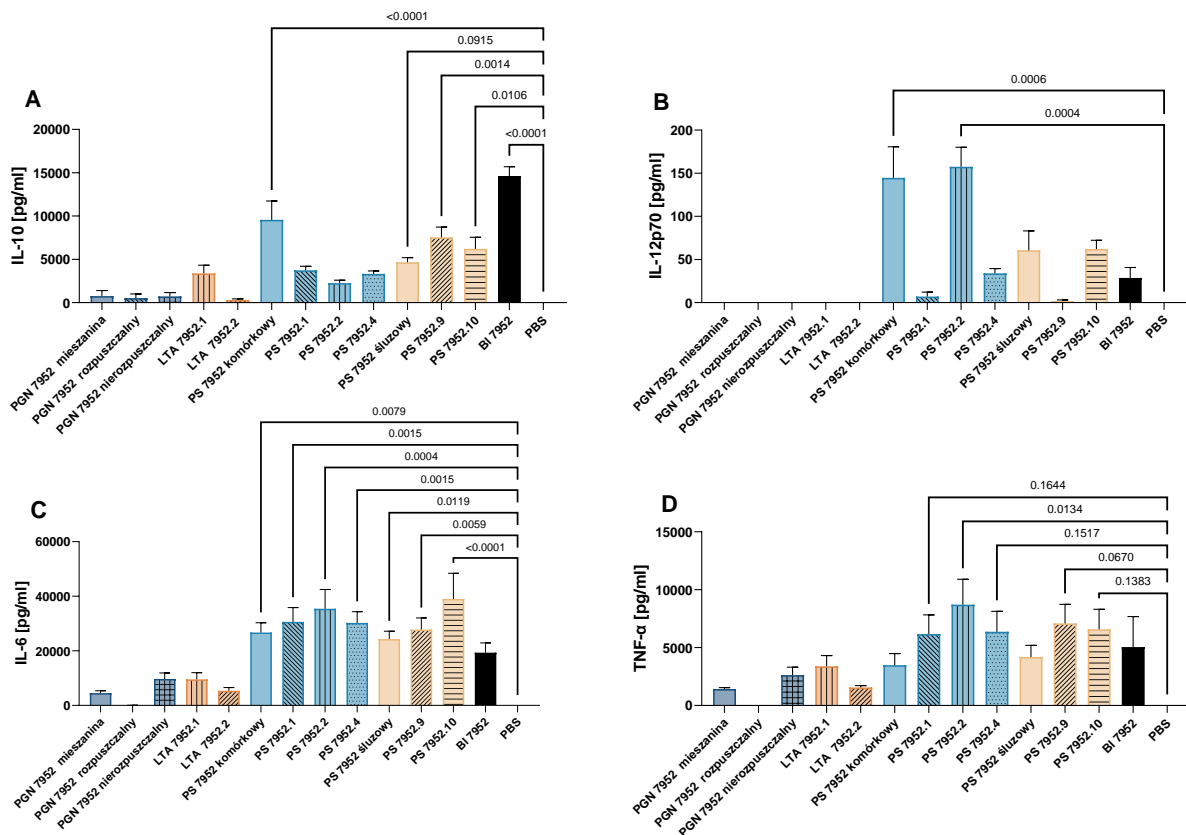
W przypadku badań nad antygenami skupiono się na określeniu ich właściwości immunomodulujących w komórkach nabłonka TC-1, naiwnych mysich komórkach dendrytycznych BMDC i splenocytach. Ponadto określono czy aktywują one receptory hNOD2, hTLR2 i hTLR4. Do stymulacji wykorzystano stężenia wykorzystane wcześniej w literaturze: 10 $\mu\text{g/ml}$ dla LTA lub peptydoglikanu i 30 $\mu\text{g/ml}$ dla polisacharydów.



Rycina 24 Wpływ wybranych antygenów BI 7952 na komórki nabłonka płucnego TC-1 w warunkach *in vitro*. Poziom (A) IL-6 i (B) MCP-1 w nadsączach komórkowych linii TC-1 został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 godzinnej stymulacji z antygenami w stężeniach 10 µg/ml dla LTA lub peptydoglikanu i 30 µg/ml dla polisacharydów. Kontrolą negatywną był PBS. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett

W pierwszej kolejności wykonano ocenę właściwości immunomodulujących na podstawie stymulacji komórek nabłonka mysiego TC-1 (Materiały i Metody 7.5.1). Kontrolę pozytywną stanowiły żywe bakterie BI 7952 o stężeniu $0,5 \times 10^7$ CFU/ml. Stymulacja PGN oraz LTA skutkowałą produkcją IL-6 na poziomie porównywalnym z kontrolą PBS. Z kolei w przypadku antygenów polisacharydowych najwyższy poziom uzyskano dla oczyszczonych polisacharydów komórkowych (PS 7952.1, PS 7952.2 i PS 7952.4), a najniższy dla mieszanin PS komórkowych i śluzowych (**Rycina 24A**). W przypadku produkcji MCP-1 mieszanina PGN indukuje najwyższy poziom tej chemokiny, nierozpuszczalna frakcja PGN indukuje trochę słabszą odpowiedź, a frakcja rozpuszczalna prawie jej nie wzbudza. W przypadku LTA nie obserwuje się znaczącego wzrostu MCP-1. Z kolei mieszaniny PS komórkowego i śluzowego wzbudzają najwyższą produkcję MCP-1 w porównaniu do rozdzielonych frakcji PS (**Rycina 24B**).

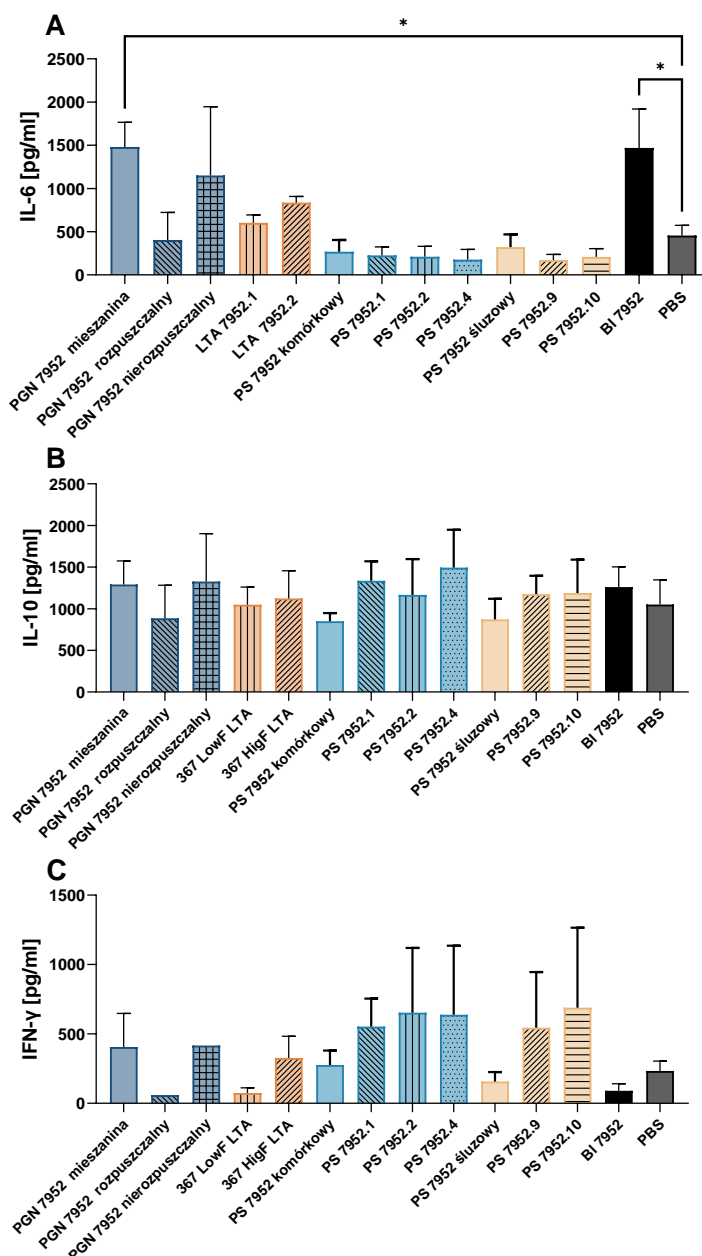
Badanie właściwości immunomodulujących badanych antygenów z wykorzystaniem komórek dendrytycznych wykazało, że PGN i LTA nie indukują produkcji IL-10, a tylko u niektórych polisacharydy wzbudziły produkcję tej cytokiny. Mieszanina PS 7952 komórkowego wzbudza znacznie większą produkcję IL-10 niż PS 7952.9 i PS 7952.10 (**Rycina 25A**). Mieszanina PS 7952 komórkowego, jak również jego frakcja PS 7952.2 indukują wysoki poziom IL-12p70. W przypadku pozostałych PS poziom jest znacznie niższy, a po stymulacji PGN i LTA w ogóle nie obserwuje się produkcji IL-12p70 (**Rycina 25B**). Podobnie obserwacje zanotowano w przypadku IL-6, której produkcja była indukowana tylko w przypadku stymulacji BMDC przez polisacharydy. Najwyższy poziom tej cytokiny uzyskano po stymulacji PS 7952.10, a pozostałe frakcje PS jak również mieszaniny PS indukują nieznacznie niższy poziom IL-6 (**Rycina 25C**). Ostatnią zbadaną cytokiną był TNF- α , którego produkcji również nie wzbudziły PGN i LTA. Wysoki poziom obserwowany jest za to dla frakcji polisacharydowych, zwłaszcza dla PS 7952.2 i PS 7952.9 (**Rycina 25D**).



Rycina 25 Wpływ antygenów powierzchniowych BI 7952 na komórki prezentujące antygen w warunkach *in vitro*. Poziom (A) IL-10, (B) IL-12p70(C) IL-6 i (D) TNF- α w nadsączach komórkowych komórek dendrytycznych BMDC został zmierzony za pomocą testu ELISA po 20 godzinnej stymulacji z wybranymi antygenami w stężeniach: 10 $\mu\text{g/ml}$ dla LTA lub peptydoglikanu i 30 $\mu\text{g/ml}$ dla polisacharydów. Kontrolą negatywną był PBS. Eksperyment został wykonany czterokrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA

Wyniki stymulacji naiwnych splenocytów badanymi antygenami wykazały, że tylko PGN indukują produkcję IL-6, jednak obserwowany jest również trend wzrostu poziomu tej cytokiny po

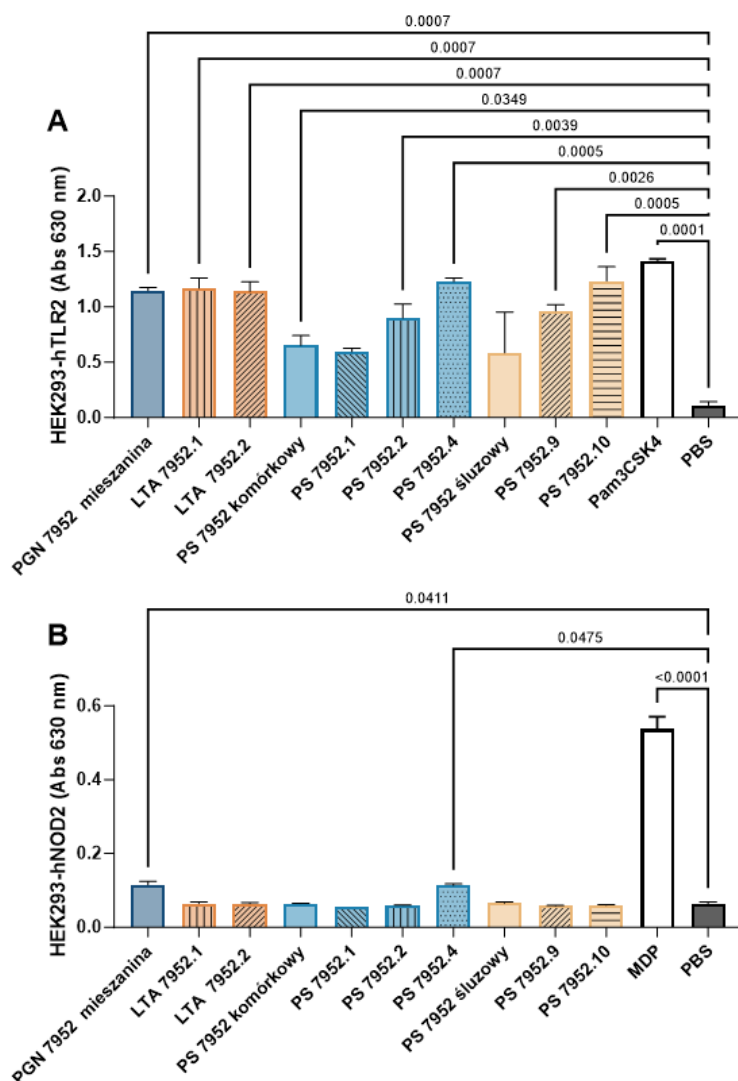
stymulacji LTA. Z kolei po stymulacji PS poziom IL-6 jest porównywany z PBSem (**Rycina 26A**). Nie obserwuje się również żadnych różnic w poziomie IL-10 między badanymi antygenami, a kontrolą negatywną (**Rycina 26B**). W przypadku IFN- γ widać, że frakcje PS mogą być w stanie wzbudzić jej produkcję, jednak duże rozrzuty spowodowane zróżnicowaną odpowiedzią immunologiczną u myszy uniemożliwiają prawidłową interpretację (**Rycina 26C**).



Rycina 26 Wpływ podania wybranych antygenów powierzchniowych na produkcję cytokin w hodowlach splenocytów pobranych z naiwnych myszy. Komórki były traktowane przez 72 godziny antygenami powierzchniowymi o stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ LTA lub peptydoglikanu i 30 $\mu\text{g/ml}$ polisacharydów. Komórki stymulowane PBS posłużyły jako kontrola negatywna. Poziom cytokin (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IFN- γ oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Eksperyment został wykonany na czterech myszach, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA

Ostatnim etapem pracy było badanie zdolności wybranych antygenów powierzchniowych z BI 7952 pod względem aktywacji receptorów hTLR2 i hDON2. Wykorzystano do tego celu

system HEK-Blue Detection (Materiały i Metody 7.5.1), w którym w czasie rzeczywistym można było obserwować kolorometryczny proces aktywacji receptorów. Receptor hTLR2 aktywowany był przez prawie wszystkie badane antygeny, jednak w przypadku PS 7952.1 jak i mieszaniny PS 7952 śluzowego są one nieistotne statystycznie (**Rycina 27A**). Najwyższą aktywację zaobserwowano dla peptydoglikanu i obu kwasów lipoteichojoych oraz poszczególnych PS tj. PS 7952.4 i PS 7952.10. Zgodnie z założeniami zaobserwowano aktywację hNOD2 przez PGN. Ciekawym była obserwacja, że jedna z frakcji polisacharydowych PS 7952.4 również aktywowała ten receptor (**Rycina 27B**). Badania nad receptorem hTLR4 wykazały, że żadna z badanych cząsteczek nie wzbudza istotnej statycznie aktywacji tego receptora (dane nie pokazane).



Rycina 27 Wpływ podania wybranych antygenów powierzchniowych na aktywację receptorów hTLR2 i hNOD2. Badanie kolorometryczne przy długości fali 630 nm posłużył jako wskaźnik aktywacji receptorów (A) hTLR2 i (B) hNOD2. Komórki stymulowano antygenami w stężeniach: 10 $\mu\text{g/ml}$ dla LTA lub peptydoglikanu i 30 $\mu\text{g/ml}$ dla polisacharydów przez 10 godzin. Jako kontrole pozytywne zastosowano ligand TLR2 Pam3CSK4 (1 $\mu\text{g/ml}$) i ligand NOD2 dipeptyd muramyłowy (MDP; 100 ng/ml), PBS został wykorzystany jako kontrola negatywna. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA

9 Dyskusja

Badania przedstawione w niniejszej pracy miały na celu określenie właściwości immunomodulujących szczepu *Bifidobacterium longum* spp. *longum* CCDM 7952, który może zostać potencjalnie wykorzystany w terapii chorób o podłożu alergicznym. Szczep ten został wybrany w oparciu o badania przesiewowe dotyczące właściwości immunomodulujących ośmiu szczepów *Bifidobacterium*. Zbadano również wpływ termicznej inaktywacji na właściwości immunomodulujące badanych szczepów. W pierwszej kolejności scharakteryzowano profil cytokinowy indukowany przez poszczególne szczepy z wykorzystaniem linii komórek immunologicznych i nabłonkowych oraz opisano właściwości fizykochemiczne badanych szczepów. Spośród nich następnie wybrano *Bifidobacterium longum* spp. *longum* CCDM 7952 (Bl 7952), którego właściwości immunomodulujące były najbardziej obiecujące. W następnym etapie przebadano właściwości tego szczepu *in vivo* wykorzystując myszy model alergii indukowany owoalbuminą. Ostatnim etapem badań było określenie właściwości immunomodulujących wybranych antygenów powierzchniowych: peptydoglikanu, kwasów lipoteichojoyowych i polisacharydów, które mogą być odpowiedzialne za obserwowany efekt biologiczny.

Pierwsza definicja bakterii probiotycznych przyjmowanych w celu poprawy zdrowia skupiała się na wykorzystaniu tylko żywych mikroorganizmów. Z biegiem czasu wyniki badań wykazały jednak, że w przypadku niektórych szczepów taki sam efekt osiągany jest przy przyjmowaniu inaktywowanych lub zabitych bakterii (Zendeboodi et al., 2020). Wykorzystanie bakterii niezdolnych do podziału niesie ze sobą wiele korzyści takich jak niskie ryzyko wystąpienia bakteremii u osób z obniżoną odpornością, czy nabycie lekooporności (Doron and Snyderman, 2015). Najpowszechniej wykorzystywaną techniką przy inaktywacji bakterii jest ich termiczna inaktywacja, która prowadzi do nieodwracalnej denaturacji białek powierzchniowych i cytoplazmatycznych (Mateus et al., 2018). Najniższą opisaną w literaturze temperaturą do termicznej inaktywacji bakterii jest temperatura 60 °C, a inkubacja bakterii trwa około jednej godziny. Z kolei najwyższą stosowaną jest temperatura 121 °C w czasie 5-10 min. Metodę tę wykorzystuje się przy inaktywacji bakterii sporulujących (Poaty Ditengou et al., 2023). Ponadto wyróżnia się działanie temperaturą na sucho i mokro. W pierwszej z technik, często wykorzystywanej w technologicznych procesach przetwarzania żywności, temperaturze poddawany jest suchy/zliofilizowany produkt. Powoduje to uwolnienie wolnych rodników, które prowadzą do denaturacji białek. Z kolei druga metoda skutkuje głównie uszkodzeniem ściany komórkowej (Smelt and Brul, 2014). W przypadku badań opisanych w niniejszej pracy termiczna inaktywacja badanych szczepów bifidobakterii prowadziła do wystąpienia zmian na powierzchni komórki, które pod mikroskopem elektronowym obserwowane były jako nieregularna i porowata

struktura. Wadą wykorzystania temperatury jako czynnika inaktywującego bakterie jest niemożliwość określenia konkretnej cząsteczki, która ulega zmianie/denaturacji (Cebrián et al., 2017). Oczywiście wysoka temperatura prowadzi do denaturacji białek, jednak należy pamiętać, że najważniejszymi białkami, które muszą jej ulec są polimerazy oraz białka opiekuńcze ponieważ to one umożliwiają regenerację komórki. Dopiero ich inaktywacja pozwala na zablokowanie syntezy innych białek niezbędnych komórkom do dalszego funkcjonowania (Nguyen et al., 2006). Do innych obserwowanych zmian wywołanych wysoką temperaturą mogą należeć utrata reszt D-alaniny, rybitolu lub glicerolu w kwasach lipoteichojoyowych lub teichojoyowych, jak opisano dla *S. aureus* (Hurst et al., 1975; Mackey, 2000) czy rozluźnienie struktur samego peptydoglikanu (Taverniti and Guglielmetti, 2011). Strukturą komórkową, która w najmniejszym stopniu ulega działaniu temperatury jest DNA, które jest cząsteczką termostabilną. Niemniej jednak, wolne rodniki, które powstają pod wpływem stresu w komórce bakteryjnej mogą prowadzić do jego uszkodzeń (Bruskov et al., 2002; Hayashi et al., 2021).

Wpływ inaktywacji termicznej na właściwości fizykochemiczne szczepów zaobserwowano zarówno przy badaniu wielkości komórek bakteryjnych jak i ich ładunku. Zmiany te są charakterystyczne dla danego szczepu, a nie rodzaju bakterii. W przypadku gatunku *Bifidobacterium adolescentis*, po termicznej inaktywacji szczepu Bad 372 obserwuje się wzrost wielkości komórki i spadek potencjału zeta, dla szczepu Bad 370 nie zaobserwowano żadnych zmian, a w przypadku Bad 368 zmianie uległ tylko potencjał zeta. Z kolei u szczepów *B. longum* ssp. *longum* widać, że oba szczepy (Bl 7952 i Bl 372) nie zmieniają potencjału zeta, jednak tylko w przypadku Bl 7952 wielkość komórek spada po termicznej inaktywacji. Niewiele jest jednak prac naukowych skupiających się na właściwościach fizykochemicznych. W większości opisywane są tylko różnice we właściwościach immunomodulujących między żywymi bądź inaktywowanymi bakteriami. W jednej z prac Baatout i współp. wykazali, że zmiany wielkości komórek są zależne od temperatury jaką się wykorzystuje do inaktywacji. Szczep *Deinococcus radiodurans* okazał się najbardziej wrażliwy na temperaturę. Różnice w wielkości komórki można było obserwować już przy wzroście temperatury z 37 °C do 45 °C. Ponadto widoczne były znaczące zmiany w przepuszczalności błony i jej potencjału błonowego. Odmienne prezentował się szczep *Ralstonia metallidurans*, u którego nie zaobserwowano zmian w rozmiarach komórki nawet przy 70 °C, pomimo iż doszło to wzrostu przepuszczalności błony i jej potencjału błonowego. Co ciekawe, dla szczepu *Deinococcus radiodurans* odnotowano, że wzrost temperatury wiąże się ze wzrostem rozmiarów komórek, a w przypadku szczepu *Shewanella oneidensis* rozmiar ten spada, gdy temperatura rośnie powyżej 60 °C (Baatout et al., 2005). Badania nad *Bacillus pumilus* i jego sporami poddany działaniu pulsacyjnego pola elektrycznego, które prowadzi do śmierci bakterii, wykazały znaczące zmiany zachodzące w ścianie komórkowej związane ze zwiększeniem się rozmiarów komórek oraz stopnia nieregularności powierzchni (Pillet et al., 2016). Podczas termicznej inaktywacji dochodzi również do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS), które to

komórka rozkłada do niegroźnych dla niej substancji. W przypadku, gdy komórka nie może poradzić sobie z dużą ilością ROS, dochodzi do śmierci komórki. Obecność martwych komórek oraz rozpad niektórych struktur bakteryjnych tj. peptydoglikan czy uwolnienie LTA i PS mogą zmieniać środowisko w jakim znajdują się inaktywowane bakterie (Fu et al., 2015). Ważną rolę w zmianie rozmiarów komórek bakteryjnych może odgrywać również pH. Baatout i współp. wykazali w innej swojej pracy, że szczepy *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Escherichia coli* CM140 posiadają zróżnicowaną odporność na zmiany pH. W przypadku pierwszego z nich dopiero wzrost pH do pH=10 skutkuje zmianą wielkości komórki, a przy pH=12 oprócz znaczącego zwiększenia objętości dochodzi również do zwiększenia porowatości ściany komórkowej. Z kolei *E. coli* CD140 jest szczepem wrażliwym na pH. Zmiana pH o jeden stopień powoduje już wystąpienie zmian na jej powierzchni jak również jej rozmiaru (Baatout et al., 2007).

Szczepy bifidobakterii oceniono pod względem przeżywalności bakterii w PBSie w temperaturze 4 °C. Uzyskane wyniki wskazują, że nie są one w stanie przeżyć 48 godzin w takich warunkach, a spadek ich ilości jest zależny od szczepu. Dla szczepów takich jak Bad 373 czy Ban 366 spadek ten jest nawet 100-krotny, z kolei 10-krotny spadek obserwuje się u szczepów tj. Bl 7952 i Bin 369. Podobne spadki przeżywalności bakterii obserwuje się w innych badaniach dotyczących metod przechowywania bakterii. Wyniki wskazują, że niska temperatura (5 °C) i wysuszenie bakterii, tak by ilość wody w preparacie była jak najmniejsza zapewniają najlepszą przeżywalność bakterii (Abe et al., 2009).

Następnie określono właściwości immunomodulujące badanych szczepów na podstawie odpowiedzi cytokinowej indukowanej w wybranych liniach komórkowych. W pierwszej kolejności sprawdzono, czy szczepy nie prowadzą do uszkodzenia bądź zniszczenia komórek eukariotycznych. W tym celu wykorzystano komórki makrofagowe RAW 264.7, które są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych modeli badań nad substancjami czynnymi czy bakteriami (Merly and Smith, 2017). Badane szczepy nie indukowały efektu cytotoksycznego oraz nie zwiększały zdolności komórek do proliferacji. W literaturze często można znaleźć odniesienia, w których szczepy *Bifidobacterium* lub ich metabolity skutkują drastycznym spadkiem przeżywalności komórek wskazując na właściwości przeciwnowotorowe. Należy jednak zwrócić uwagę, że dawki bakterii były znacznie większe niż te wykorzystana w obecnej pracy. W badaniach ludzkiej linii raka żołądka MKN1 traktowanej zabitymi termicznie szczepami *Bifidobacterium* w stężeniu 10^8 i 10^9 CFU/ml wykazano, że wyższe stężenie bakterii wywołuje w komórkach apoptozę (Kim et al., 2022). Podobnie, w przypadku badań nad ludzkimi nowotorowymi komórkami nabłonkowymi HT-29 i LS174T traktowanymi *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* UABla-12 w ilości 10^9 CFU/ml obserwowano znaczący spadek ilości komórek obu linii (Vemuri et al., 2018). Opiswane są również wyniki wskazujące, że to metabolity produkowane przez bifidobakterie do pożywki hodowlanej odpowiadają za ich właściwości cytotoksyczne. Wyniki stymulacji linii ludzkiego raka okrężnicy SW742 pokazały, że pożywki

pohodowlane szczepów takich jak *B. bifidum* CPFD2 i IFH47 wykazują znacznie wyższe właściwości cytotoksyczne niż innych szczepów bifidobakterii (Bahmani et al., 2019). Z kolei praca grupy Faghfoori, wskazuje, że w zależności od badanej ludzkiej linii nabłonkowej metabolity różnych szczepów bifidobakterii mogą wykazywać zróżnicowany efekt cytotoksyczny. Najlepsze właściwości do hamowania wzrostu lub uśmiercania komórek miał szczep *B. animalis* ssp. *lactis* PTCC1736, który we wszystkich trzech liniach (HT-29, Caco-2 i KRD/293) prowadził do spadku ilości komórek. W porównaniu do niego szczep *B. angulatum* ATCC 27535 (PTCC 1366) był cytotoksyczny tylko dla komórek linii Caco-2 (Faghfoori et al., 2021).

Jedną z pierwszych reakcji na zmiany środowiska jakie zachodzą w komórkach jest produkcja tlenu azotu. Będąc cząsteczką efektorową ma ona krótki okres stabilności przez co może być wskaźnikiem lokalnej odpowiedzi immunologicznej. Szerokie właściwości tlenu azotu obejmują wpływ na agregację płytek krwi i leukocytów, modulacje ośrodkowego układu nerwowego, regulację mechanizmów immunologicznych czy motoryki jelit (Bryan and Grisham, 2007). Wyniki oznaczenia poziomu azotynów w linii RAW 264.7 wykazały, że wszystkie nietraktowane szczepy bifidobakterii indukowały ich produkcję. Po termicznej inaktywacji tylko w przypadku szczepów Bad 368, Bad 370 i Bin 369 ich poziom nie ulega zmianie. W przypadku szczepów Bl 372, Bl 7952, Ban 366 i Bad 218 poziom ten znacząco spadł, a tylko w przypadku Bad 373 wzrósł. Azotyny są stabilnymi produktami przemiany tlenu azotu, który produkowany jest przez komórki pełniąc w organizmie różne ważne funkcje takie jak modulowanie poziomu wolnych rodników, hamowania agregacji leukocytów, oddziaływania na motorykę jelit oraz hamowania wzrostu komórek nowotworowych czy mikroorganizmów (Shreshtha et al., 2018). Określenie czy produkowany przez komórkę NO w odpowiedzi na kontakt z mikroorganizmami ma działanie przeciw- czy pro-zapalne zależy od wielu składowych, w tym stężenia w jakim jest produkowany. Wysoki poziom NO sprzyja różnicowaniu się makrofagów o właściwościach cytostatycznych i cytotoksycznych (Torres et al., 2004), a gdy pojawia się w odpowiedzi na infekcję wirusem Denga może prowadzić do gorączki krwotocznej (Mendes-Ribeiro et al., 2008). Z kolei niski poziom NO częściej chroni przed apoptozą i śmiercią komórki (Shreshtha et al., 2018). W przypadku stymulacji niektórymi szczepami bifidobakterii komórek iBMDM obserwuje się spadek produkcji NO wywołany wcześniejszym podaniem LPS (Zabłocka et al., 2023). Wyniki podobnych badań z wykorzystaniem termicznie inaktywowanych szczepami *Lactobacillus* na linii makrofagowej RAW 264.7 aktywowanej LPS również wskazały, że poziom indukcji produkcji NO zależy od użytego szczepu (Kang et al., 2021). Co ciekawe, w pracy Pipenbaher i współp. wykazano, że badane przez nich bifidobakterie, w przeciwieństwie do niektórych szczepów *Lactobacillus*, nie indukują wytwarzania NO przez komórki linii nabłonkowej IPEC-J2, jednakże są zdolne do indukcji wytwarzania NO przez komórki linii makrofagowej 3D4/21. Poziom był jednak zależny od szczepu. W przypadku *B. bifidum* DSM 20082 poziom NO pozostał zerowy, a po stymulacji szczepami *B. bifidum* DSM 20456 wzrósł o $61.04 \pm 38.44\%$ i *B. bifidum* DSM 20239

o $25.97 \pm 15.74\%$ w porównaniu do kontroli (Pipenbaher et al., 2009). Ponadto wykazano, że produkcja NO może zależeć również od ilości bakterii wykorzystanych do stymulacji, ich żywotności i obecności IFN- γ w pożywce hodowlanej. Stymulacja makrofagów 3D4/21 żywym *B. longum* Q46 w stężeniu 2×10^6 CFU prowadziła do wzrostu poziomu NO ($26.32 \pm 14.33\%$) w porównaniu do kontroli, jednak podanie IFN- γ do hodowli skutkowało znaczącym obniżeniem poziomu NO $-49.61 \pm 3.72\%$, w porównaniu do kontroli. Natomiast, gdy komórki stymulowano 2×10^8 CFU bakterii dochodzi do spadku poziomu NO o $14.14 \pm 5.53\%$, a z kolei w obecności IFN- γ obserwowano bardzo wysoki wzrost ($54.37 \pm 10.25\%$) w porównaniu do kontroli. W przypadku termicznie inaktywowanych bakterii stymulacja niskim stężeniem bakterii bez/z IFN- γ nie indukuje produkcji NO, ale przy stymulacji komórek wyższym stężeniem CFU produkcja NO sięgała $61.84 \pm 9.33\%$ w porównaniu do kontroli, a obecność IFN- γ nie miała wpływu na produkcję tlenu (Pipenbaher et al., 2009).

Oprócz badania poziomu NO i właściwości cytotoksycznych, bifidobakterie zostały scharakteryzowane pod względem właściwości immunomodulujących. Określono jakie cytokiny indukują badane szczepy, zarówno jako żywe i termicznie inaktywowane bakterie. Wyniki wskazują, że profil cytokiny badanych bakterii zależy jest od wykorzystanego szczepu oraz formy w jakiej były podane. Potwierdzają to szereg opublikacji, w których również wskazują, że właściwości bifidobakterii zależne są od badanego szczepu oraz stężenia bakterii. Ponadto różnice obserwowane są w zależności od wykorzystanej linii oraz modelu (Habil et al., 2011; Han et al., 2005; Lee et al., 2021; Park et al., 1999). Uwagę po tym etapie prac zwrócił szczep B1 7952, który podawany jako żywe bakterie wzbudzał produkcję takich cytokin jak IL-10, MCP-1 czy TNF- α w komórkach makrofagowych oraz GM-CSF w komórkach nabłonkowych. Należy pamiętać, że makrofagi stanowią znaczącą część komórek immunologicznych w płucach i jelitach, pełniąc ważną rolę w regulacji stanu zapalnego wywołanego infekcją lub rozwojem nowotworu. Są one zróżnicowaną populacją, która może działać zarówno przeciw- i pro-zapalnie w zależności od sygnałów jakie otrzyma ze środowiska. Głównymi subpopulacjami są tu makrofagi klasyczne (określane jako M1) i alternatywnie aktywowane (określane jako M2). Makrofagi M1 powiązane są z odpowiedzią Th1 i są aktywowane przez mikroorganizmy i ich antygeny oraz przez INF- γ . Z kolei M2 działają bardziej przeciw-zapalnie i odpowiadają za usunięcie martwych komórek, dlatego też są powiązane ze szlakiem Th2. Odpowiedni balans między tymi populacjami umożliwia utrzymanie wewnętrznej homeostazy chroniąc równocześnie przed chorobami autoimmunologicznymi (Saradna et al., 2018).

Cytokiny IL-6 i MCP-1 produkowane przez nabłonek w odpowiedzi na obecność badanych nietraktowanych i termicznie inaktywowanych bifidobakterii mogą być zaangażowane w procesy rekrutacji makrofagów oraz ich dojrzewania (Liu et al., 2018). Co więcej, MCP-1 aktywuje szlak Th1 w reakcji przeciwko bakteriom umożliwiając oczyszczenie miejsca zapalnego z martwych komórek (Ukena et al., 2005). Nietraktowane szczepy Ban 366, Bad 368 czy Bin 369 indukowały znaczącą produkcję obu tych alarmin, z kolei szczepy takie jak B1 372, Ban 218 i Bad 373

produkowały tylko MCP-1. Tylko BI 7952 i Bad 370 nie wzbudzały ich produkcji w komórkach nabłonkowych.

W niniejszej pracy zbadano również różnice w pochłanianiu i przekazywaniu komórek bakteryjnych przez komórki eukariotyczne. Pomiędzy badanymi szczepami oraz w zależności czy są podawane jako nietraktowane czy termicznie inaktywowane widać znaczące różnice w zdolności komórek nabłonkowych do pochłaniania bakterii i przekazywania ich komórkom dendrytycznym. W przypadku większości szczepów nie obserwuje się różnic w pochłanianiu bakterii. Do wyjątków należą BI 7952, Bad 373 i Bin 369, gdzie ilość pochłanianych bakterii po termicznej inaktywacji uległa znaczącemu spadkowi. Inaktywacja jednak znacznie większy wpływ na przekazywanie bakterii między komórkami nabłonka, a komórkami rozpoznającymi antygen. U pięciu z ośmiu (BI 372, Ban 366, Bad 368, Bad 373 i Bin 369) szczepów obserwuje się spadek poziomu przekazywania. Co ciekawe różnic nie obserwuje się w szczepie BI 7952, u którego jak wcześniej wspomniano obserwowane są różnice w pochłanianiu między nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami. Termiczna inaktywacja obniżała znacząco te możliwości. Do podobnych wniosków doszli Galdeano i współp., którzy podali myszom żywe i termicznie inaktywowane szczepy *Lactobacillus* w wodzie pitnej. Żywe bakterie wpływały na wiele różnych typów komórek u jelicie grubym i cienkim stymulując je do produkcji cytokin tj. INF- γ , IL-12, IL-10 czy IL-4. Inaktywowane bakterie znaleziono natomiast na powierzchni światła jelita, gdzie wraz z treścią pokarmową ulegały szybkiemu usunięciu z organizmu (Galdeano and Perdigón, 2004). Termiczna inaktywacja może wpływać na skład ściany komórkowej skutkując uwolnieniem luźno związanych polisacharydowych cząsteczek. W konsekwencji te pozytywnie bądź neutralnie naładowane polisacharydy mogą być odpowiedzialne za wiązanie się do negatywnie naładowanych ścian komórek eukariotycznych i umożliwiać bakterii lepsze przyleganie (Pacyga-Prus et al., 2023).

Co ciekawe wyniki stymulacji komórek dendrytycznych szczepami *Bifidobacterium*, zarówno nietraktowanymi jak i termicznie inaktywowanymi wykazały znaczące różnice w ich właściwościach modulatorowych. W przypadku badanych szczepów widać, że indukują znacznie wyższy poziom IL-10 (10000 - 30000 pg/ml) niż IL-12p70 (100 - 300 pg/ml). Szczepy Ban 366, Bad 373 i Bin 369 indukowały najniższy poziom IL-10, podczas gdy szczepy BI 7952, Ban 218, Bad 368 i Bad 370 indukowały poziom wyższy niż 25000 pg/ml. Z kolei najniższy poziom produkcji IL-12p70 w komórkach dendrytycznych był obserwowany po stymulacji BI 7952, Ban 366, Ban 218 i Bad 370, a najwyższy dla BI 372.

Wysoka produkcja IL-10 w przypadku stymulacji bakteriami wykorzystywanymi w niniejszej pracy może wskazywać, bakterie te prowadzą do polaryzacji limfocytów w kierunku limfocytów T_{reg} lub komórek regulatorowych typu 1 (Schülke, 2018). W przypadku obserwacji wysokiego poziomu IL-12 indukowanego mikroorganizmami dochodzi z kolei do polaryzacji Th1 (Hamza et al., 2010). Szczepy bifidobakterii badane przez Weissa i współp. z wykorzystaniem

mysich komórek dendrytycznych również indukowały wysokie poziomy IL-10 i IL-12p70 (Weiss et al., 2011). Co ciekawe w badaniach nad wpływem sonikacji na właściwości immunomodulatorowe szczepów bakterii tworzących preparat VSL#3 zaobserwowano, że oba preparaty indukują dojrzewanie i produkcję cytokin, jednakże ich poziom jest znacząco wyższy dla żywych bakterii. Widać również, że przypadku tego preparatu ilość wyprodukowanej cytokiny IL12p70 jest znacznie wyższa niż IL-10 (Mastrangeli et al., 2009).

W dalszym etapie badań skupiono uwagę na określeniu różnic w aktywacji receptorów rozpoznających wzorce. Wszystkie badane w niniejszej pracy szczepy bifidobakterii aktywowały receptor TLR2. Poziom aktywacji zależał jednak od badanego szczepu, wskazując szczepy Bad 368, Bad 370 i Bad 373 jako te o największym potencjale do aktywacji TLR2, a Ban 366 jako ten o najniższym. Aktywacja receptora TLR2 jest znacznie silniejsza po termicznej inaktywacji u większości badanych szczepów. Może to być spowodowane zmianami w strukturach ściany komórkowej, które pozwalają na łatwiejszy dostęp antygenów powierzchniowych do miejsca wiązania się z receptorem (Oliveira-Nascimento et al., 2012). W literaturze często podawane są informacje, że aktywacja receptora TLR2 jest charakterystyczna dla bakterii wykazujących właściwości probiotyczne (Bermúdez-Brito et al., 2012). Ponadto wykazano, że receptor ten bierze udział w reakcji przeciwalergicznej i indukuje odpowiedź limfocytów Th1 (Fuchs and Braun, 2008). Badania nad znanym probiotykiem *B. animalis* ssp. *lactis* Bb12 wskazały, że indukuje on produkcję 40 różnych mikroRNA (krótko łańcuchowe cząsteczki RNA regulujące ekspresję innych genów), z czego 15 mikroRNA powiązanych zostało z aktywacją receptora TLR2. Z analizy bioinformatycznej wynika, że mikroRNA powiązane z receptorem TLR2 odpowiedzialne są za aktywację kompleksu NF- κ B, biorącego udział w procesach zapalnych, regulują szereg procesów komórkowych, takich jak apoptoza, różnicowanie komórek oraz ich proliferację (Arenas-Padilla et al., 2022). Z kolei badania na ochotnikach przyjmujących inaktywoane *S. aureus* wykazały, że aktywacja receptora TLR2 u osób z alergią na HDM prowadzi do aktywacji komórek prezentujących antygen, które to hamowały odpowiedź cytokinową szlaku Th2 (Taylor et al., 2006). Większość prac skupia się ogólnie na receptorze TLR2, jednak należy pamiętać, że w komórce działa on jako heterodimer z receptorem TLR1 lub TLR6. Dimerowi TLR2/TLR6 przypisuje się promowanie odpowiedzi angażującej limfocyty T_{reg}, z kolei dimer TLR2/TLR1 wykazuje właściwości pro-zapalne (Ren et al., 2016). Zeuthen i współp. prowadzili badania nad właściwościami biologicznymi bifidobakterii z wykorzystaniem komórek dendrytycznych nie posiadających receptora TLR2 (TLR2 -/-). Wykazali, że produkcja IL-10 znacząco spada w tych komórkach, a wzrasta IL-12p70. Co ciekawe w tych samych badaniach wykorzystano również szczepy *Lactobacillus*, u których takiego efektu nie zaobserwowano. Równocześnie naukowcy badali komórki dendrytyczne nie posiadające receptora NOD2 (NOD2 -/-) i zaobserwowali, że po stymulacji bifidobakteriami produkowały one znacznie mniejszy poziom IL-12p70, ale większy IL-10 niż normalne komórki dendrytyczne (Zeuthen et al., 2008).

Wyniki uzyskane ze stymulacji linii immunologicznych i nabłonkowych oraz badanie pochłaniania przez komórki nabłonka i przekazywania komórkom dendrytycznym bakterii umożliwiło opracowanie obszernego profilu immunomodulującego badanych bifidobakterii. Z obserwacji wynika, że właściwości oddziaływania na komórki eukariotyczne zależy od szczepu oraz tego czy zostały podane termicznej inaktywacji. Z ośmiu szczepów wyselekcjonowano cztery o zróżnicowanych właściwościach immunomodulujących oraz fizykochemicznych. W kolejnej części pracy porównano właściwości niektraktowanych i termicznie inaktywowanych bifidobakterii do hamowania odpowiedzi immunologicznej z wykorzystaniem splenocytów wyizolowanych z myszy uwrażliwionych na OVA. Wszystkie badane szczepy były zdolne do hamowania cytokin szlaku Th2 takich jak IL-4, IL-5 i IL-13. Za wyjątkiem szczepu B1 7952 niezdolnego do indukcji IFN- γ w splenocytach uwrażliwionych na OVA, wszystkie szczepy stymulowały aktywację szlaku Th1. Analizując wpływ wysokiej temperatury na właściwości bakterii nie stwierdzono dużych różnic w profilu cytokinowym. W literaturze dotyczącej badań z wykorzystaniem mysich modeli alergii można znaleźć sporo doniesień dotyczących bifidobakterii i laktobacilli hamujących odpowiedź Th2 przy równoczesnej indukcji szlaku Th1. Przykładowo, w mysim modelu alergii wywołanej podaniem OVA podanie szczepu *L. casei* strain Shiota prowadziło do spadku poziomu IL-4 i IL-5 przy równoczesnym wzroście IFN- γ , IL-2 i IL-12 produkowanych przez splenocyty (Matsuzaki and Chin, 2000). Stymulacja splenocytów izolowanych z myszy uwrażliwionych na OVA szczepem *Bifidobacterium* BGN-4 również prowadziła do spadku poziomu IL-4 i wzrost IFN- γ (Kim et al., 2005). Badania z wykorzystaniem splenocytów z myszy uwrażliwionych alergenem pyłku *Parietaria judaica* (Parj) wykazały, że zarówno żywe jak i sonikowane bakterie wchodzące w skład preparatu VSL#3 hamują odpowiedź alergiczną Th2 przy równoczesnej indukcji IL-10 i IFN- γ przesuując równowagę w kierunku limfocytów T_{reg} (Mastrangeli et al., 2009). Do kolejnych etapów badań wybrano szczep B1 7952, który pomimo, iż nie podwyższał IL-10 czy IFN- γ nadal obniżał poziom cytokin szlaku Th2. Mechanizm działania zatem może być całkowicie odmienny niż ten, który najczęściej opisywany jest w literaturze. Postanowiono zatem bardziej dokładnie scharakteryzować właściwości immunomodulujące tego szczepu. Co więcej, Schwarzer i współp. w 2013 roku opublikowali badania dotyczące monokolonizacji młodych myszy germ-free szczepem B1 7952 i wykazali, że szczep ten chroni przed rozwojem alergii wywołanej pyłkiem brzozy (Bet v1). Ponadto wskazali, że to prawdopodobnie aktywacja szlaku sygnałowego MAPK zainicjowanego aktywacją receptorów TLR2 i MyD88 odpowiada za właściwości tego szczepu (Schwarzer et al., 2013). W niniejszej pracy szczep ten przebadano w innym modelu alergii, mianowicie alergii wziewnej indukowanej OVA. Zbadano również wpływ inaktywacji termicznej na jego właściwości. Uzyskane dane wykazały, że zarówno nietraktowane czy termicznie inaktywowe bakterie B1 7952 łagodzą stan zapalny, jednak w zależności od statusu żywotności bakterii stopień wyciszenia reakcji alergicznej był różny. Badania profilu cytokinowego w surowicy krwi obwodowej

wykazały, że oba preparaty hamują produkcję IL-5, lecz tylko nietraktowany BI 7952 hamuje dodatkowo IL-4 i IL-13. Nietraktowane bakterie prowadziły również do obniżenia poziomu IL-10 oraz IL-6. Z kolei w grupie myszy przyjmującej termicznie inaktywowany BI 7952 poziomy obu tych cytokin były zbliżone do poziomu grupy kontrolnej otrzymującej PBS. Badanie poziomu przeciwciał w surowicy krwi obwodowej wskazało, że w grupie przyjmującej nietraktowane bakterie poziom OVA-specyficznych przeciwciał IgE, IgG1 i IgG2 spadł. Tak znacznych zmian nie obserwuje się w grupie przyjmującej termicznie inaktywowany BI 7952, gdzie obniżeniu uległ poziom jedynie przeciwciał IgG2 specyficznych dla OVA. Brak różnic w poziomie przeciwciał nie musi jednak świadczyć o braku skuteczności. Jak wykazały badania nad donosowym podaniem *L. rhamnosus* GG w mysim modelu alergii na pyłek brzozy, poziomy przeciwciał skierowanych przeciw pyłkowi nie spadły, niemniej jednak *L. rhamnosus* GG skutecznie hamował reakcję alergiczną (Spacova et al., 2019, 2020).

W obu grupach badawczych tj. UN BI 7952 oraz HT BI 7952 nie obserwuje się zmian w poziomie całkowitych IgA. Dalsze badania wykazały, że dochodzi jednak do wzrostu poziomu przeciwciał IgA, które były specyficzne dla samych bakterii. Należy podkreślić, że przeciwciała te rozpoznawały jedynie nietraktowane bakterie. Może to oznaczać, że w skutek działania temperatury część antygenów powierzchniowych uległa zmianie, skutkując dezaktywacją epitopów rozpoznawanych przez limfocytów B i tym samym brak produkcji przeciwciał IgA (Golias et al., 2012). Wydzielnicze IgA (sIgA) pełnią istotną funkcję w procesach zapewnienia homeostazy i tolerancji na powierzchni błon śluzowych. Biorą udział w opsonizacji i neutralizacji patogenów i toksyn (Corthésy, 2013; Smeekens et al., 2021). Zauważono, że IgA specyficzne dla glikanów mikrobioty jelitowej są obecne u zdrowych myszy, co może wskazywać, że przeciwciała te są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania śluzówki (Bello-Gil et al., 2019). Niski poziom przeciwciał IgA powiązany został z brakiem dojrzewania układu immunologicznego (Kubinak et al., 2015), co zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju astmy i alergii (Dzidic et al., 2017; Kim et al., 2017). Co ciekawe, jak wynika z badań Li i współp. nie wszystkie bakterie posiadają umiejętność indukcji przeciwciał IgA. Z pięciu badanych szczepów bakteryjnych tylko trzy szczepy z rodzaju *L. casei* indukowały produkcję tych przeciwciał w mysim modelu astmy wywołanej roztoczą kurzu domowego (Li et al., 2020). W niniejszej pracy, układ oddechowy jest głównym miejscem, gdzie dochodzi do rozwoju reakcji alergiczej wywołanej podaniem OVA. W obu grupach badawczych tj. UN BI 7952 oraz HT BI 7952 zaobserwowano duży spadek ilości eozynofili w płucach jednak w przypadku grupy traktowanej termicznie inaktywowanym szczepem zauważono wzrost liczby neutrofilii i makrofagów. Podobne wyniki uzyskano dla szczepu *B. breve* MRx0004, którego terapeutyczne i profilaktyczne wykorzystanie badano w modelu mysiej astmy wywołanej HDM. Szczep ten oprócz zmniejszenia ilości eozynofili w płucach równocześnie zwiększał liczbę makrofagów (Raftis et al., 2018). Wyniki analizy popołączyn oskrzelowo-pęcherzykowych wskazują, że zarówno UN BI 7952 jak i HT BI 7952 obniża poziom cytokin IL-4

i IL-5. W obu grupach spada również poziom IL-6, ale jest on bardziej znaczący w grupie przyjmującej nietraktowany B1 7952. Interesujące wyniki uzyskano w przypadku IL-10 i IL-17A. Grupa myszy przyjmująca nietraktowane B1 7952 miała podwyższony poziom obu tych cytokin, z kolei grupa przyjmująca termicznie inaktywowane bakterie charakteryzowała się jedynie podniesionym poziomem IL-17A. IL-10 pełni rolę cytokiny immunosupresorowej wpływając na szlak limfocytów T_{reg} (Akdis and Akdis, 2014). Bardzo interesującą cytokiną jest IL-17A, której udział w odpowiedzi alergicznej powszechnie wiązany był z pogorszeniem reakcji zapalnej. U pacjentów z astmą poziom zarówno IL-17A i IL-17F jest podniesiony, a ich ilość jest skorelowana ze stopniem choroby oraz steroidoopornością (Al-Ramli et al., 2009; Östling et al., 2019). Wysoki poziom IL-17A i IFN- γ zaobserwowano u pacjentów z steroidooporną astmą (Chambers et al., 2015). Cytokina ta należy do szlaku limfocytów Th17 i ILC3 odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi, dojrzewanie struktur układu limfatycznego oraz ściąganie neutrofilów do miejsca zapalenia. Główną rolą obu szlaków jest usunięcie pasożytów (Zeng et al., 2019). Badania *in vitro* wykazały, że IL-17 nie ma wpływu na funkcjonowanie komórek kubkowych i migawkowych, jednak może wpływać na produkcję śluzu poprzez indukcję genów MUC5B (Jiao et al., 2016). Współzależności między Th2 i Th17 są skomplikowane i nie jest jasne jak IL-17A może działać hamująco na rozwój reakcji szlaku Th2 (Choy et al., 2015; Newcomb et al., 2013). Co ciekawe, badania Ajendra i współp. wykazały jednak, że właściwości IL-17A mogą zależeć od środowiska w jakim się znajduje. Wskazywałoby to, że należy ona do białek plejotropowych tzw. „moonlight proteins”, które są cząsteczkami plastycznymi, a ich właściwości mogą ulegać zmianie. W badaniach na myszach, w początkowym etapie aktywacji szlaku Th2 w płucach wywołanej infekcją pasożytniczą, IL-17A promowała szlak Th2 poprzez hamowanie produkcji IFN- γ . Z kolei w trakcie trwania infekcji, gdy poziom cytokin szlaku Th2 był wysoki, IL-17A działała immunosupresorowo i obniżała poziom IL-13, IL-5 i IL-4 (Ajendra et al., 2020). Co ciekawe badania nad *Bordetella pseudohinzii*, mikroorganizmem naturalnie występującym w mysim mikrobiomie układu oddechowego wykazały, że bakteria ta indukuje IL-17A zwiększając ilość limfocytów Th17. Równocześnie zaobserwowano zwiększoną liczbę limfocytów T regulatorowych. Wyniki te jednak zaobserwowano tylko w przypadku podania myszom żywych bakterii, a nie inaktywowanych termicznie. Wykazano, że podanie żywych *B. pseudohinzii* prowadzi do spadku ilości eozynofili oraz ekspresji genów cytokin szlaku Th2 (Jaeger et al., 2020). Wcześniej wspomniano, że szlak Th17 powiązany jest ze zwiększoną liczbą neutrofilów w miejscu zapalenia. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy zauważono, że poziom neutrofilów wzrasta jedynie po podaniu termicznie inaktywowany B1 7952. Poziom IL-17A w tej grupie jest wyższy niż w grupie kontrolnej, ale niższy niż w przypadku myszy, którym podano nietraktowane B1 7952.

W obu badanych grupach oprócz obniżonego poziomu cytokin szlaku Th2, obserwowano niższy poziom OVA-specyficznych przeciwciał IgE w BALF. U myszy przyjmujących nietraktowany B1 7952 zaobserwowano ponadto podniesiony poziom całkowitych przeciwciał IgA

przy równoczesnym braku różnic w poziomie OVA-specyficznych IgA przeciwciał. Wzrost ten był ponownie spowodowany obecnością przeciwciał IgA, które były specyficzne dla samych bakterii.

W ostatnim etapie pracy skupiono się na izolacji, oczyszczeniu i ocenie właściwości immunomodulujących antygenów powierzchniowych BI 7952. Identyfikacja cząsteczki efektorowej pozwoliłaby na dokładniejsze poznanie mechanizmów działania badanej bakterii. Należy pamiętać, że bakterie dostosowują się do środowiska w którym się znajdują. Skutkuje to zmianami w składzie ściany komórkowej bakterii, a tym samym może być powodem rozbieżności między badaniami prowadzonymi w laboratorium, a wykonywanymi na ludziach (Abbad Andaloussi et al., 1995; Dörr et al., 2019). Szczególną uwagę zwróciły następujące antygeny: PGN, LTA i PS, które to często opisywane są jako cząsteczki efektorowe w reakcjach immunologicznych (Gao et al., 2022; Pyclik et al., 2020). Najlepiej opisanymi w literaturze antygenami bifidobakterii są polisacharydy. Zmiana stężenia lub usunięcie pojedynczego składnika w środowisku zewnętrznym lub pożywcze hodowlanej może spowodować zmiany zarówno w ilości produkowanego PS jak i jego składzie. W przypadku usunięcia ekstraktu wołowego z MRS obserwuje się spadek ilości polisacharydów bifidobakterii w porównaniu do MRS zawierającego ekstrakt ale nie zawierającego ekstraktu drożdżowego albo peptonu (Ferrari et al., 2022). Taka zmienność umożliwia EPS wiązanie cząsteczki do antygenów bakterii patogennych ograniczając ich wiązanie do śluzu komórek gospodarza, co pomaga w przywróceniu integralności membrany, czy wpływa na właściwości adhezyjne bakterii (Oerlemans et al., 2021). LTA odgrywa często rolę kotwicy, która umożliwia patogennym bakteriom tj. *S. aureus* czy *S. pneumoniae* kolonizację gospodarza. Dodatkowo umożliwia bakterii manipulować ładunkiem na powierzchni komórki, co wpływa na tolerancję lub oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (Wu et al., 2021). Z kolei PGN jest cząsteczką najmniej zróżnicowaną chemicznie (Wolf and Underhill, 2018b).

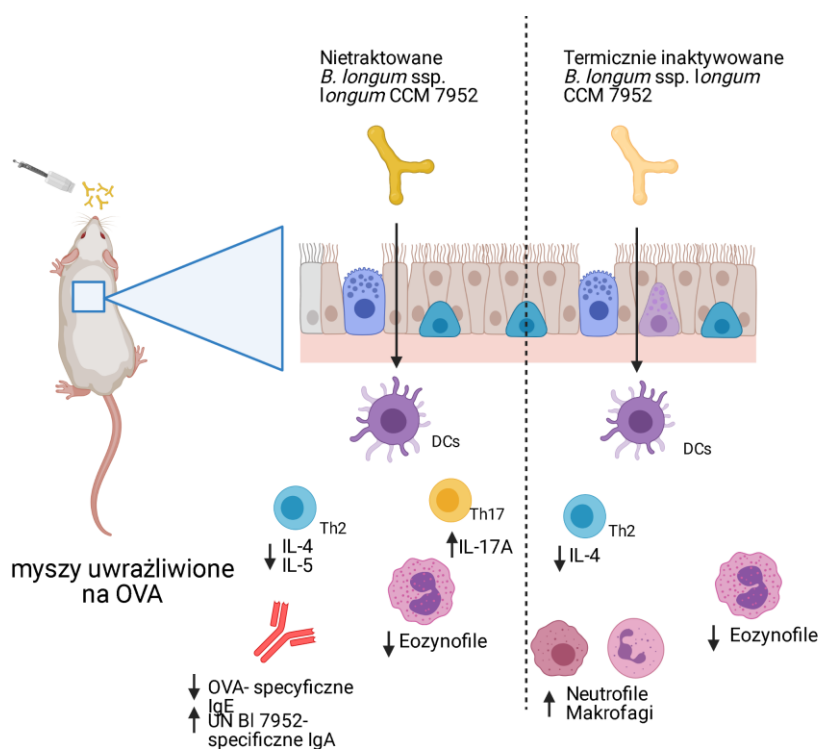
W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem wybranych linii komórkowych i pierwotnych stymulowanych antygenami widać, że głównymi cząsteczkami immunomodulującymi są frakcje polisacharydowe. Ich wpływ zaobserwowano zarówno w komórkach nabłonkowych oraz naiwnych komórkach dendrytycznych i splenocytach. Polisacharydy są najobszerniej opisaną grupą antygenów bifidobakterii pod względem właściwości immunomodulujących. BAP1 z *B. adolescentis* CCDM 368 hamuje produkcję cytokin szlaku Th2 przy równoczesnej indukcji IFN- γ w splenocytach myszy uwrażliwionych na OVA (Pacyga-Prus et al., 2023). A PS z *B. bifidum* PRI1 indukuje w myszach GF produkcję limfocytów T_{reg} (Verma et al., 2018b). Z kolei EPS z *B. longum* 35624 reguluje aktywację szlaku Th17 w modelach mysiego zapalenia jelit i uwrażliwienia na OVA (Schiavi et al., 2016). Co ciekawe wyniki z komórek nabłonkowych wskazują, że PGN również może w pewnym stopniu wpływać na odpowiedź immunologiczną komórek.

Komórka bakteryjna jest złożoną strukturą, która na swojej powierzchni posiada szereg antygenów umożliwiających jej zasiedlanie środowiska, pobieranie i przekazywanie cząsteczek

oraz ochronę przed czynnikami zewnętrznymi. Niektóre z antygenów tj. polisacharydy czy kwasy lipotejchajowe mogą ulegać modyfikacjom w zależności od środowiska w jakim bakterie się znajdują, inne takie jak peptydoglikan są bardziej konserwatywnymi strukturami (Pyclik et al., 2020). Podsumowując, badane antygeny wykazują się właściwościami immunomodulujących w badanych modelach.

10 WNIOSKI

- Wykazano, że właściwości immunomodulujące *in vitro* badanych szczepów bifidobakterii zależą od szczepu oraz żywotności bakterii.
- Donosowe podanie nietraktowanych BI 7952 łagodzi reakcję alergiczną wywołaną podaniem OVA (**Rycina 28**).
- Inaktywacja bakterii wysoką temperaturą zmniejsza zdolność BI 7952 do łagodzenia reakcji alergicznej w mysim modelu alergii na OVA (**Rycina 28**).
- Wyniki badań na antygenach powierzchniowych mogą sugerować, że właściwości BI 7952 stanowią sumę właściwości antygenów występujących na jej powierzchni, dlatego też zastąpienie całej bakterii pojedynczym antygenem w tym przypadku nie jest możliwe.



Rycina 28 Graficzne przedstawienie działania *B. longum* ssp. *longum* CCD 7952 w mysim modelu uwrażliwienia na OVA (Biorender.com)

11 LITERATURA

- Abbad Andaloussi, S., Talbaoui, H., Marczak, R., and Bonaly, R. (1995). Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 995–1000. doi:10.1007/BF00166915.
- Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P., et al. (2021). Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents: Mechanism and Spectrum of Activity. *Front. Microbiol.* 12. doi:10.3389/fmicb.2021.664395.
- Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T., and Iwatsuki, K. (2009). Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 234–239. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00464.x.
- Agache, I., Annesi-Maesano, I., Bonertz, A., Branca, F., Cant, A., Frasci, Z., et al. (2019). Prioritizing research challenges and funding for allergy and asthma and the need for translational research—The European Strategic Forum on Allergic Diseases. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 2064–2076. doi:10.1111/all.13856.
- Aguilar-Toalá, J. E., Arioli, S., Behare, P., Belzer, C., Berni Canani, R., Chatel, J. M., et al. (2021). Postbiotics — when simplification fails to clarify. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 825–826. doi:10.1038/S41575-021-00521-6.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., et al. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* 75, 105–114. doi:10.1016/J.TIFS.2018.03.009.
- Ajendra, J., Chenery, A. L., Parkinson, J. E., Chan, B. H. K., Pearson, S., Colombo, S. A. P., et al. (2020). IL-17A both initiates, via IFN γ suppression, and limits the pulmonary type-2 immune response to nematode infection. *Mucosal Immunol.* 13, 958–968. doi:10.1038/s41385-020-0318-2.
- Akdis, C. A., and Akdis, M. (2014). Mechanisms of immune tolerance to allergens: Role of IL-10 and Tregs. *J. Clin. Invest.* 124, 4678–4680. doi:10.1172/JCI78891.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801. doi:10.1016/J.CELL.2006.02.015.
- Al-Asmakh, M., and Zadjali, F. (2015). Use of germ-free animal models in microbiota-related research. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1583–1588. doi:10.4014/jmb.1501.01039.
- Al-Ramli, W., Préfontaine, D., Chouiali, F., Martin, J. G., Olivenstein, R., Lemièrre, C., et al. (2009). TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1185–1187. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.024.
- Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., Drab, M., Strus, M., and Gamian, A. (2019). Identification and characterization of phage protein and its activity against two strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 9, 1–14. doi:10.1038/s41598-019-50030-5.
- Alessandri, G., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2021). The genus *Bifidobacterium*: from genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 1472–1487. doi:10.1016/J.CSBJ.2021.03.006.
- Allen, J. E., and Sutherland, T. E. (2014). Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Semin. Immunol.* 26, 329–340. doi:10.1016/j.smim.2014.06.003.
- Alm, B., Erdes, L., Mollborg, P., Pettersson, R., Norvenius, S. G., Aberg, N., et al. (2008). Neonatal Antibiotic Treatment Is a Risk Factor for Early Wheezing. *Pediatrics* 121, 697–702. doi:10.1542/peds.2007-1232.
- Aloisio, I., Prodam, F., Giglione, E., Bozzi Cionci, N., Solito, A., Bellone, S., et al. (2018). Three-Month Feeding Integration With *Bifidobacterium* Strains Prevents Gastrointestinal Symptoms in Healthy Newborns. *Front. Nutr.* 5, 39. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2018.00039>.
- Altmann, F., Kosma, P., O’Callaghan, A., Leahy, S., Bottacini, F., Molloy, E., et al. (2016). Genome Analysis and Characterisation of the Exopolysaccharide Produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 35624TM. *PLoS One* 11, e0162983. Available at:

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162983>.
- Alvaro-Lozano, M., Akdis, C. A., Akdis, M., Alviani, C., Angier, E., Arasi, S., et al. (2020). EAACI Allergen Immunotherapy User's Guide. *Pediatr. Allergy Immunol.* 31, 1–101. doi:10.1111/pai.13189.
- Arboleya, S., Bottacini, F., O'Connell-Motherway, M., Ryan, C. A., Ross, R. P., van Sinderen, D., et al. (2018). Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains. *BMC Genomics* 19, 1–16. doi:10.1186/s12864-017-4388-9.
- Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., and Ross, R. P. (2016). Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Front. Microbiol.* 7, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2016.01204.
- Arenas-Padilla, M., González-Rascón, A., Hernández-Mendoza, A., Calderón de la Barca, A. M., Hernández, J., and Mata-Haro, V. (2022). Immunomodulation by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12: Integrative Analysis of miRNA Expression and TLR2 Pathway-Related Target Proteins in Swine Monocytes. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 14, 510–522. doi:10.1007/s12602-021-09816-1.
- Arunachalam, K., Gill, H. S., and Chandra, R. K. (2000). Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 263–267. doi:10.1038/SJ.EJCN.1600938.
- Ashida, H., Tanigawa, K., Kiyohara, M., Katoh, T., Katayama, T., and Yamamoto, K. (2018). Bifunctional properties and characterization of a novel sialidase with esterase activity from *Bifidobacterium bifidum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 2030–2039. doi:10.1080/09168451.2018.1497944.
- Asong, J., Wolfert, M. A., Maiti, K. K., Miller, D., and Boons, G. J. (2009). Binding and cellular activation studies reveal that toll-like receptor 2 can differentially recognize peptidoglycan from gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 284, 8643–8653. doi:10.1074/jbc.M806633200.
- Astó, E., Huedo, P., Altadill, T., Aguiló García, M., Sticco, M., Perez, M., et al. (2022). Probiotic Properties of *Bifidobacterium longum* KABP042 and *Pediococcus pentosaceus* KABP041 Show Potential to Counteract Functional Gastrointestinal Disorders in an Observational Pilot Trial in Infants. *Front. Microbiol.* 12. doi:10.3389/fmicb.2021.741391.
- Atarashi, K., Suda, W., Luo, C., Kawaguchi, T., Motoo, I., Narushima, S., et al. (2017). Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science (80-)*. 358, 359–365.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., et al. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163, 367–380. doi:10.1016/j.cell.2015.08.058.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., et al. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species. *Science* 331, 337. doi:10.1126/SCIENCE.1198469.
- Avcin, S. L., Pokorn, M., Kitanovski, L., Premru, M. M., and Jazbec, J. (2015). *Bifidobacterium breve* sepsis in child with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1674–1675. doi:10.3201/eid2109.150097.
- Azad, M. B., Konya, T., Guttman, D. S., Field, C. J., Sears, M. R., Hayglass, K. T., et al. (2015). Infant gut microbiota and food sensitization: Associations in the first year of life. *Clin. Exp. Allergy* 45, 632–643. doi:10.1111/cea.12487.
- Baatout, S., De Boever, P., and Mergeay, M. (2005). Temperature-induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Ann. Microbiol.* 55, 73–80.
- Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A., and Mergeay, M. (2007). Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. *Acta Astronaut.* 60, 451–459. doi:10.1016/j.actaastro.2006.09.012.
- Bahmani, S., Azarpira, N., and Moazamian, E. (2019). Anti-colon cancer activity of *Bifidobacterium* metabolites on colon cancer cell line SW742. *Turkish J. Gastroenterol.* 30, 835–842. doi:10.5152/tjg.2019.18451.
- Balaguer, F., Enrique, M., Llopis, S., Barrera, M., Navarro, V., Álvarez, B., et al. (2022). Lipoteichoic acid from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL1: a novel postbiotic that

- reduces fat deposition via IGF-1 pathway. *Microb. Biotechnol.* 15, 805–816. doi:10.1111/1751-7915.13769.
- Barnes, P. J. (2001). Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 56, 928–936. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00001.x.
- Belizário, J. E., and Faintuch, J. (2018). Microbiome and Gut Dysbiosis. *Exp. Suppl.* 109, 459–476. doi:10.1007/978-3-319-74932-7_13.
- Bello-Gil, D., Audebert, C., Olivera-Ardid, S., Pérez-Cruz, M., Even, G., Khasbiullina, N., et al. (2019). The formation of glycan-specific natural antibodies repertoire in Galt-KO mice is determined by gut microbiota. *Front. Immunol.* 10, 1–13. doi:10.3389/fimmu.2019.00342.
- Berbers, R. M., Nierkens, S., van Laar, J. M., Bogaert, D., and Leavis, H. L. (2017). Microbial Dysbiosis in Common Variable Immune Deficiencies: Evidence, Causes, and Consequences. *Trends Immunol.* 38, 206–216. doi:10.1016/J.IT.2016.11.008.
- Bergey, D. H., Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., and Hans-Jürgen, B. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 5.*, eds. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, et al. New York, NY: Springer New York doi:10.1007/978-0-387-68233-4.
- Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174. doi:10.1159/000342079.
- Berne, B., and Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics.* Courier Corporation.
- Bertelli, C., Pillonel, T., Torregrossa, A., Prod'hom, G., Julie Fischer, C., Greub, G., et al. (2015). Bifidobacterium longum bacteremia in preterm infants receiving probiotics. *Clin. Infect. Dis.* 60, 924–927. doi:10.1093/cid/ciu946.
- Biavati, B., Scardovi, V., and Moore, W. E. C. (1982). Electrophoretic patterns of proteins in the genus Bifidobacterium and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 358–373. doi:10.1099/00207713-32-3-358.
- Bonnegarde-bernard, A., Jee, J., Fial, M. J., Aeffner, F., Davis, I. C., Lin, M., et al. (2014). IKK β in intestinal epithelial cells regulates allergen-specific IgA and allergic inflammation at distant mucosal sites. *Mucosal Immunol.* 7, 257–267. doi:10.1038/mi.2013.43.IKK.
- Boonpiyathad, T., Sözen, Z. C., Satitsuksanoa, P., and Akdis, C. A. (2019). Immunologic mechanisms in asthma. *Semin. Immunol.* 46, 101333. doi:10.1016/j.smim.2019.101333.
- Borbet, T. C., Pawline, M. B., Li, J., Ho, M. L., Yin, Y. S., Zhang, X., et al. (2023). Disruption of the early-life microbiota alters Peyer's patch development and germinal center formation in gastrointestinal-associated lymphoid tissue. *iScience* 26. doi:10.1016/j.isci.2023.106810.
- Borbet, T. C., Pawline, M. B., Zhang, X., Wiperman, M. F., Reuter, S., Maher, T., et al. (2022). Influence of the early-life gut microbiota on the immune responses to an inhaled allergen. *Mucosal Immunol.* 15, 1000–1011. doi:10.1038/s41385-022-00544-5.
- Brioukhanov, A. L., and Netrusov, A. I. (2004). Catalase and Superoxide Dismutase: Distribution, Properties, and Physiological Role in Cells of Strict Anaerobes. *Biochem.* 96, 949–962.
- Bruskov, V. I., Malakhova, L. V., Masalimov, Z. K., and Chernikov, A. V. (2002). Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res.* 30, 1354–1363. doi:10.1093/nar/30.6.1354.
- Bryan, N. S., and Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 645–657. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.
- Bunyavanich, S., and Berin, M. C. (2019). Food Allergy and the Microbiome: Current Understandings and Future Directions. *J Allergy Clin Immunol.* 144, 1468–1477. doi:10.1016/j.jaci.2019.10.019.Food.
- Burzyńska, M., and Piasecka-Kwiatkowska, D. (2021). A review of honeybee venom allergens and allergenicity. *Int. J. Mol. Sci.* 22. doi:10.3390/ijms22168371.
- Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B., and McCoy, K. D. (2013). Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 14, 559–570. doi:10.1016/j.chom.2013.10.004.
- Castro-Bravo, N., Margolles, A., Wells, J. M., and Ruas-Madiedo, P. (2019). Exopolysaccharides synthesized by Bifidobacterium animalis subsp. lactis interact with TLR4 in intestinal

- epithelial cells. *Anaerobe* 56, 98–101. doi:10.1016/J.ANAEROBE.2019.02.014.
- Cebrián, G., Condón, S., and Mañas, P. (2017). Physiology of the Inactivation of Vegetative Bacteria by Thermal Treatments: Mode of Action, Influence of Environmental Factors and Inactivation Kinetics. *Foods* 6, 107. doi:10.3390/foods6120107.
- Chambers, E. S., Nanzer, A. M., Pfeiffer, P. E., Richards, D. F., Timms, P. M., Martineau, A. R., et al. (2015). Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A high and IFN- γ high immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 628–637.e4. doi:10.1016/j.jaci.2015.01.026.
- Chateau, A., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2019). Extraction and Purification of Wall-Bound Polymers of Gram Positive Bacteria. *Methods Mol Biol* 1954, 47–57. doi:10.1007/978-1-4939-9154-9.
- Chen, Y., Wang, W., Yuan, H., Li, Y., Lv, Z., Cui, Y., et al. (2021). Current State of Monoclonal Antibody Therapy for Allergic Diseases. *Engineering* 7, 1552–1556. doi:10.1016/j.eng.2020.06.029.
- Choy, D. F., Hart, K. M., Borthwick, L. A., Shikotra, A., Nagarkar, D. R., Siddiqui, S., et al. (2015). TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci. Transl. Med.* 7. doi:10.1126/scitranslmed.aab3142.
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H., Flannery, E., et al. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15, 4586–91. doi:10.1073/pnas.10000971107.
- Cohn, L., Homer, R. J., Marinov, A., Rankin, J., and Bottomly, K. (1997). Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: A critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J. Exp. Med.* 186, 1737–1747. doi:10.1084/jem.186.10.1737.
- Colagiorgi, A., Mancabelli, L., Serafini, F., van Sinderen, D., Secchi, A., Turrone, F., et al. (2015). Insights into teichoic acid biosynthesis by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, fnv141. doi:10.1093/femsle/fnv141.
- Cooper, J. E., and Feil, E. J. (2004). Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 373–377. doi:10.1016/J.TIM.2004.06.003.
- Corthésy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 4, 1–11. doi:10.3389/fimmu.2013.00185.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., and Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res. Int.* 136, 109502. doi:10.1016/j.foodres.2020.109502.
- Currell, A., Koplín, J. J., Lowe, A. J., Perrett, K. P., Ponsonby, A. L., Tang, M. L. K., et al. (2022). Mode of Birth Is Not Associated With Food Allergy Risk in Infants. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 10, 2135–2143.e3. doi:10.1016/j.jaip.2022.03.031.
- Daniela, M. S., Claudia, Y. H., Adnan, Y. T., and Maricecirc, N. de O. (2011). Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. *African J. Microbiol. Res.* 5, 3901–3906. doi:10.5897/ajmr11.598.
- Day, R. L. J., Harper, A. J., Woods, R. M., Davies, O. G., and Heaney, L. M. (2019). Probiotics: Current landscape and future horizons. *Futur. Sci. OA* 5. doi:10.4155/fsoa-2019-0004.
- de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R., and Sant'Ana, A. S. (2016a). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 58, 96–114. doi:10.1016/J.TIFS.2016.09.011.
- de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R., and Sant'Ana, A. S. (2016b). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 58, 96–114. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.011.
- De Vuyst, L., and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 153–77. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x.
- Delcaru, C., Alexandru, I., Podgoreanu, P., Cristea, V. C., Bleotu, C., Chifiriuc, M. C., et al. (2016). Antagonistic activities of some *Bifidobacterium* sp. strains isolated from resident

- infant gastrointestinal microbiota on Gram-negative enteric pathogens. *Anaerobe* 39, 39–44. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.02.010.
- Deng, L., Kasper, D. L., Krick, T. P., and Wessels, M. R. (2000). Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B streptococcus. *J. Biol. Chem.* 275, 7497–7504. doi:10.1074/jbc.275.11.7497.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J. Interf. Cytokine Res.* 29, 313–325. doi:10.1089/jir.2008.0027.
- Devi, T. B., Devadas, K., George, M., Gandhimathi, A., Chouhan, D., Retnakumar, R. J., et al. (2021). Low Bifidobacterium Abundance in the Lower Gut Microbiota Is Associated With Helicobacter pylori-Related Gastric Ulcer and Gastric Cancer. *Front. Microbiol.* 12, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2021.631140.
- Dhanashree, Rajashekharan, S., Krishnaswamy, B., and Kammara, R. (2017). Bifid shape is intrinsic to Bifidobacterium adolescentis. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.00478.
- Doron, S., and Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* 60, S129–S134. doi:10.1093/cid/civ085.
- Dörr, T., Moynihan, P. J., and Mayer, C. (2019). Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Front. Microbiol.* 10, 4–7. doi:10.3389/fmicb.2019.02051.
- Drinić, M., Wagner, A., Sarate, P., Zwicker, C., Korb, E., Loupal, G., et al. (2017). Toxoplasma gondii tachyzoite-extract acts as a potent immunomodulator against allergic sensitization and airway inflammation. *Sci. Rep.* 7, 1–12. doi:10.1038/s41598-017-15663-4.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. Available at: <https://www.nature.com/articles/168167a0>.
- Duranti, S., Gaiani, F., Mancabelli, L., Milani, C., Grandi, A., Bolchi, A., et al. (2016). Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw191. doi:10.1093/FEMSEC/FIW191.
- Duranti, S., Longhi, G., Ventura, M., van Sinderen, D., and Turrone, F. (2021). Exploring the ecology of bifidobacteria and their genetic adaptation to the mammalian gut. *Microorganisms* 9, 1–18. doi:10.3390/microorganisms9010008.
- Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Armanini, F., Turrone, F., James, K., et al. (2017). Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome* 5, 1–13. doi:10.1186/S40168-017-0282-6/FIGURES/5.
- Duranti, S., Lugli, G. A., Napoli, S., Anzalone, R., Milani, C., Mancabelli, L., et al. (2019). Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus Bifidobacterium: Bifidobacterium castoris sp. nov., Bifidobacterium callimiconis sp. nov., Bifidobacterium goeldii sp. nov., Bifidobacterium samirii sp. nov. and Bifidobacterium dolichotidis sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 1288–1298. doi:10.1099/ijsem.0.003306.
- Duranti, S., Ruiz, L., Lugli, G. A., Tames, H., Milani, C., Mancabelli, L., et al. (2020). Bifidobacterium adolescentis as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Sci. Rep.* 10, 1–13. doi:10.1038/s41598-020-70986-z.
- Dylus, E., Buda, B., Gorska-Fraczek, S., Brzozowska, E., and Gamian, A. (2013). [Surface proteins of bacteria of the genus Bifidobacterium]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. doi:10.5604/17322693.1049285.
- Dziarski, R., and Gupta, D. (2006). Mammalian PGRPs: Novel antibacterial proteins. *Cell. Microbiol.* 8, 1059–1069. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00726.x.
- Dzidic, M., Abrahamsson, T. R., Artacho, A., Björkstén, B., Collado, M. C., Mira, A., et al. (2017). Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1017–1025.e14. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.047.
- Eberl, G., Colonna, M., Santo, J. P. D., and McKenzie, A. N. J. (2015). Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science (80-)*. 348. doi:10.1126/science.aaa6566.
- Emal, D., Rampanelli, E., Stroo, I., Butter, L. M., Teske, G. J., Claessen, N., et al. (2017).

- Depletion of gut microbiota protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28, 1450–1461. doi:10.1681/ASN.2016030255.
- Erdoğan, Ö., Tanyeri, B., Torun, E., Gönüllü, E., Arslan, H., Erenberk, U., et al. (2012). The comparison of the efficacy of two different probiotics in rotavirus gastroenteritis in children. *J. Trop. Med.* 2012. doi:10.1155/2012/787240.
- Esaiassen, E., Hjerde, E., Cavanagh, J. P., Simonsen, G. S., and Klingenberg, C. (2017). Bifidobacterium bacteremia: Clinical characteristics and a genomic approach to assess pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2234–2248. doi:10.1128/JCM.00150-17.
- Espinosa-Riquer, Z. P., Segura-Villalobos, D., Ramírez-Moreno, I. G., Pérez Rodríguez, M. J., Lamas, M., and Gonzalez-Espinosa, C. (2020). Signal Transduction Pathways Activated by Innate Immunity in Mast Cells: Translating Sensing of Changes into Specific Responses. *Cells* 9. doi:10.3390/cells9112411.
- Faghfoori, Z., Faghfoori, M. H., Saber, A., Izadi, A., and Yari Khosroushahi, A. (2021). Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 21, 1–12. doi:10.1186/s12935-021-01971-3.
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., et al. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2108–13. doi:10.1073/pnas.1115621109.
- FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- Fazlollahi, M., Chun, Y., Grishin, A., Wood, R. A., Burks, A. W., Dawson, P., et al. (2018). Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 1515–1524. doi:10.1111/all.13389.
- Feng, C., Zhang, W., Zhang, T., He, Q., Kwok, L. Y., Tan, Y., et al. (2022). Heat-Killed Bifidobacterium bifidum B1628 May Alleviate Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice, and the Anti-Inflammatory Effect Is Associated with Gut Microbiota Modulation. *Nutrients* 14. doi:10.3390/nu14245233.
- Ferrari, M., Hameleers, L., Stuart, M. C. A., Oerlemans, M. M. P., de Vos, P., Jurak, E., et al. (2022). Efficient isolation of membrane-associated exopolysaccharides of four commercial bifidobacterial strains. *Carbohydr. Polym.* 278. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118913.
- Fischer, W. (1994). *Lipoteichoic acids and lipoglycans*. doi:10.1016/S0167-7306(08)60413-5.
- Fontana, C., and Widmalm, G. (2022). Primary Structure of Glycans by NMR Spectroscopy. *Chem. Rev.* doi:10.1021/acs.chemrev.2c00580.
- Foroni, E., Serafini, F., Amidani, D., Turrone, F., He, F., Bottacini, F., et al. (2011). Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus Bifidobacterium. *Microb. Cell Fact.* 10. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S16.
- Fu, H., Yuan, J., and Gao, H. (2015). Microbial oxidative stress response: Novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 584, 28–35. doi:10.1016/j.abb.2015.08.012.
- Fuchs, B., and Braun, A. (2008). Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. *J. Occup. Med. Toxicol.* 3, 2–5. doi:10.1186/1745-6673-3-S1-S5.
- Fujimura, K. E., Sitarik, A. R., Havstad, S., Lin, D. L., Levan, S., Fadrosh, D., et al. (2016). Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat. Med.* 22, 1187. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4176>.
- Gabay, O., Vicenty, J., Smith, D., Tiffany, L., Ascher, J., Curry, T., et al. (2020). Using a model of germ-free animals to study the impact of gut microbiome in research: A step by step sterility setting and management. *Methods Protoc.* 3, 1–8. doi:10.3390/mps3010018.
- Gajdanowicz, P., Van Elst, D., Smolińska, S., Eljaszewicz, A., O'Mahony, L., Kettner, A., et al. (2020). The frequency of CD4 + CD25 + FoxP3 + CD127 – cells in Bet v 1 contiguous overlapping peptide immunotherapy as a putative marker of efficacy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 75, 2685–2686. doi:10.1111/all.14342.
- Galdeano, C. M., and Perdígón, G. (2004). Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J. Appl. Microbiol.* 97, 673–681. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02353.x.

- Ganal, S. C., Sanos, S. L., Kallfass, C., Oberle, K., Johnner, C., Kirschning, C., et al. (2012). Priming of Natural Killer Cells by Nonmucosal Mononuclear Phagocytes Requires Instructive Signals from Commensal Microbiota. *Immunity* 37, 171–186. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.020.
- Gao, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., and Zhai, Q. (2022). Modulation of gut health using probiotics: the role of probiotic effector molecules. *J. Futur. Foods* 2, 1–12. doi:10.1016/j.jfutfo.2022.03.011.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Lemay, D. G., Sela, D. A., German, J. B., and Mills, D. A. (2015). Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria. *Sci. Reports* 2015 51 5, 1–18. doi:10.1038/srep13517.
- George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., and Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* 26, 927–939. doi:10.1016/j.jfda.2018.01.002.
- Gleinser, M., Grimm, V., Zhurina, D., Yuan, J., and Riedel, C. U. (2012). Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the Bifidobacterium bifidum-specific lipoprotein BopA. *Microb. Cell Fact.* 11, 1. doi:10.1186/1475-2859-11-80.
- Golias, J., Schwarzer, M., Wallner, M., Kverka, M., Kozakova, H., Srutkova, D., et al. (2012). Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One* 7, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0037156.
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Clark, A. G., and Ley, R. E. (2017). The Relationship Between the Human Genome and Microbiome Comes into View. *Annu. Rev. Genet.* 51, 413–433. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155532.
- Gordon, E. D., Simpson, L. J., Rios, C. L., Ringel, L., Lachowicz-Scroggins, M. E., Peters, M. C., et al. (2016). Alternative splicing of interleukin-33 and type 2 inflammation in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 8765–8770. doi:10.1073/pnas.1601914113.
- Górska, S., Dylus, E., Rudawska, A., Brzozowska, E., Srutkova, D., Schwarzer, M., et al. (2016). Immunoreactive proteins of bifidobacterium longum ssp. longum ccm 7952 and Bifidobacterium longum ssp. longum CCDM 372 identified by gnotobiotic mono-colonized mice sera, immune rabbit sera and non-immune human sera. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01537.
- Górska, S., Jarzab, A., and Gamian, A. (2009). Probiotic bacteria in the human gastrointestinal tract as a factor stimulating the immune system. *Postepy Hig. i Med. doświadczalnej* 63, 653–667.
- Górska, S., Schwarzer, M., Srutkova, D., Hermanova, P., Brzozowska, E., Kozakova, H., et al. (2017). Polysaccharides L900/2 and L900/3 isolated from Lactobacillus rhamnosus LOCK 0900 modulate allergic sensitization to ovalbumin in a mouse model. *Microb. Biotechnol.* 10, 586–593. doi:10.1111/1751-7915.12606.
- Greenberg, J. W., Fischer, W., and Joiner, K. A. (1996). Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect. Immun.* 64, 3318–3325.
- Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Mora, D., Minuzzo, M., Scarafoni, A., Arioli, S., et al. (2008). Implication of an Outer Surface Lipoprotein in Adhesion of Bifidobacterium bifidum to Caco-2 Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 4695–4702. doi:10.1074/jbc.M712408200.
- Guglielmetti, S., Zanoni, I., Balzaretto, S., Miriani, M., Taverniti, V., de Noni, I., et al. (2014). Murein lytic enzyme TgaA of Bifidobacterium bifidum MIMBb75 modulates dendritic cell maturation through its cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) amidase domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5170–5177. doi:10.1128/AEM.00761-14.
- Guo, B., Xie, N., and Wang, Y. (2015a). Cooperative effect of Bifidobacteria lipoteichoic acid combined with 5-fluorouracil on hepatoma-22 cells growth and apoptosis. *Bull. Cancer* 102, 204–212. doi:10.1016/J.BULCAN.2014.09.003.
- Guo, L., Huang, Y., Chen, X., Hu-Li, J., Urban Jr., J. F., and Paul, W. F. (2015b). Innate Immune Function of TH 2 Cells in vivo. *Nat Immunol.* 16, 1051–1059. doi:10.1038/ni.3244.
- Haahtela, T., Holgate, S., Pawankar, R., Akdis, C. A., Benjaponpitak, S., Caraballo, L., et al. (2013). The biodiversity hypothesis and allergic disease: World allergy organization position

- statement. *World Allergy Organ. J.* 6, 1. doi:10.1186/1939-4551-6-3.
- Habil, N., Al-Murrani, W., Beal, J., and Foey, A. (2011). Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Benef. Microbes* 2, 283–293. doi:10.3920/BM2011.0027.
- Hamza, T., Barnett, J. B., and Li, B. (2010). Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 789–806. doi:10.3390/ijms11030789.
- Han, C., Ding, Z., Shi, H., Qian, W., Hou, X., and Lin, R. (2016). The Role of Probiotics in Lipopolysaccharide-Induced Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 38, 2464–2478. doi:10.1159/000445597.
- Han, S., Cho, K., Lee, C.-K., Song, Y., Park, S. H., Ha, N.-J., et al. (2005). Enhancement of antigen presentation capability of dendritic cells and activation of macrophages by the components of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* SPM 1204. *J. Appl. Pharmacol.* 13, 174–180.
- Hapfelmeier, S., Lawson, M. A. E., Slack, E., Kirundi, J. K., Stoel, M., Heikenwalder, M., et al. (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* (80-.). 328, 1705–1709. doi:10.1126/science.1188454.
- Hayashi, M., Sugahara, K., Yamamura, A., and Iida, Y. (2021). Evaluation of the Properties of the DNA Methyltransferase from *Aeropyrum pernix* K1. *Microbiol. Spectr.* 9, 1–10. doi:10.1128/spectrum.00186-21.
- Henrick, B. M., Rodriguez, L., Lakshmikanth, T., Pou, C., Henckel, E., Arzoomand, A., et al. (2021). Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell* 184, 3884–3898.e11. doi:10.1016/j.cell.2021.05.030.
- Hickey, A., Stamou, P., Udayan, S., Ramón-Vázquez, A., Esteban-Torres, M., Bottacini, F., et al. (2021). Bifidobacterium breve Exopolysaccharide Blocks Dendritic Cell Maturation and Activation of CD4+ T Cells. *Front. Microbiol.* 12, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2021.653587.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Moro-García, M. A., Blanco-Míguez, A., Fdez-Riverola, F., Lourenço, A., Alonso-Arias, R., et al. (2017). In silico screening of the human gut metaproteome identifies Th17-promoting peptides encrypted in proteins of commensal bacteria. *Front. Microbiol.* 8, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2017.01726.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Nikolic, M., López, P., Suárez, A., Miljkovic, M., Kojic, M., et al. (2014). Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe* 26, 24–30. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.01.003.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 11, 506. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- Hollams, E. M., Hales, B. J., Bachert, C., Huvenne, W., Parsons, F., De Klerk, N. H., et al. (2010). Th2-associated immunity to bacteria in teenagers and susceptibility to asthma. *Eur. Respir. J.* 36, 509–516. doi:10.1183/09031936.00184109.
- Hollmig, S. T., Ariizumi, K., and Cruz, P. D. (2009). Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2. *Glycobiology* 19, 568–575. doi:10.1093/glycob/cwp032.
- Hong, H., Liao, S., Chen, F., Yang, Q., and Wang, D. Y. (2020). Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 75, 2794–2804. doi:10.1111/all.14526.
- Hoyles, L., Inganäs, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A. L., et al. (2002). *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 995–999. doi:10.1099/ijs.0.02065-0.
- Hughes, K. R., Harnisch, L. C., Alcon-Giner, C., Mitra, S., Wright, C. J., Ketskemety, J., et al. (2017). *Bifidobacterium breve* reduces apoptotic epithelial cell shedding in an exopolysaccharide and MyD88-dependent manner. *Open Biol.* 7. doi:<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160155>.
- Hurst, A., Hughes, A., Duckworth, M., and Baddiley, J. (1975). Loss of D alanine during sublethal heating of *Staphylococcus aureus* S6 and magnesium binding during repair. *J.*

- Gen. Microbiol.* 89, 277–284. doi:10.1099/00221287-89-2-277.
- Ippolito, M. M., Denny, J. E., Langelier, C., Sears, C. L., and Schmidt, N. W. (2018). Malaria and the microbiome: A systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 67, 1831–1839. doi:10.1093/cid/ciy374.
- Irazoki, O., Hernandez, S. B., and Cava, F. (2019). Peptidoglycan muropeptides: Release, perception, and functions as signaling molecules. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00500.
- Ishikawa, E., Yamada, T., Yamaji, K., Serata, M., Fujii, D., Umesaki, Y., et al. (2021). Critical roles of a housekeeping sortase of probiotic *Bifidobacterium bifidum* in bacterium–host cell crosstalk. *iScience* 24, 103363. doi:10.1016/j.isci.2021.103363.
- Ismail, I. H., Boyle, R. J., Licciardi, P. V., Oppedisano, F., Lahtinen, S., Robins-Browne, R. M., et al. (2016). Early gut colonization by *Bifidobacterium breve* and *B. catenulatum* differentially modulates eczema risk in children at high risk of developing allergic disease. *Pediatr. Allergy Immunol.* 27, 838–846. doi:10.1111/PAI.12646.
- Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delley, M., Fisseha, M., et al. (2006). A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J. Biol. Chem.* 281, 17246–17252. doi:10.1074/jbc.M601678200.
- Iwasaki, H., Nagaoka, M., Araki, Y., Yokokura, T., and Ito, E. (1990). Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *J. Bacteriol.* 172, 845–852. doi:10.1128/jb.172.2.845-852.1990.
- Jaeger, N., McDonough, R. T., Rosen, A. L., Hernandez-Leyva, A., Wilson, N. G., Lint, M. A., et al. (2020). Airway Microbiota-Host Interactions Regulate Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Levels and Influence Allergic Airway Inflammation. *Cell Rep.* 33, 108331. doi:10.1016/j.celrep.2020.108331.
- Ji-Hyun, J., Hee Woong, S., Jung Min, L., Hyeon-Woo, L., Eun-Cheol, K., and Sang Hyuk, P. (2015). An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators Inflamm.* 2015, 12. doi:10.1155/2015/794143.
- Ji, T., and Li, H. (2023). T-helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma. *Front. Immunol.* 14, 1149203. doi:10.3389/fimmu.2023.1149203.
- Jiao, J., Duan, S., Meng, N., Li, Y., Fan, E., and Zhang, L. (2016). Role of IFN- γ , IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* 46, 449–460. doi:10.1111/cea.12644.
- Jiménez-Saiz, R., Anipindi, V. C., Galipeau, H., Ellenbogen, Y., Chaudhary, R., Koenig, J. F., et al. (2020). Microbial Regulation of Enteric Eosinophils and Its Impact on Tissue Remodeling and Th2 Immunity. *Front. Immunol.* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00155.
- Johansson, M. E. V., Sjövall, H., and Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 352–361. doi:10.1038/nrgastro.2013.35.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., and Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
- Justiz Vaillant, A., Modi, P., and Jan, A. (2023). Atopy. *StatPearls Publ.* Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542187/?report=classic>.
- Kainulainen, V., Reunanen, J., Hiippala, K., Guglielmetti, S., Vesterlund, S., Palva, A., et al. (2013). BopA Does Not Have a Major Role in the Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Intestinal Epithelial Cells, Extracellular Matrix Proteins, and Mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6989 LP – 6997. doi:10.1128/AEM.01993-13.
- Kang, C. H., Kim, J. S., Kim, H., Park, H. M., and Paek, N. S. (2021). Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Inhibit Nitric Oxide Production via Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cells. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 13, 1530–1538. doi:10.1007/s12602-021-09781-9.
- Katoh, T., Ojima, M. N., Sakanaka, M., Ashida, H., Gotoh, A., and Katayama, T. (2020). Enzymatic Adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to Host Glycans, Viewed from Glycoside Hydrolyases and Carbohydrate-Binding Modules. *Microorg.* 2020, Vol. 8, Page 481 8, 481. doi:10.3390/MICROORGANISMS8040481.

- Kelly, S. M., Lanigan, N., O'neill, I. J., Bottacini, F., Lugli, G. A., Viappiani, A., et al. (2020). Bifidobacterial biofilm formation is a multifactorial adaptive phenomenon in response to bile exposure. *10*, 11598. doi:10.1038/s41598-020-68179-9.
- Kennedy, E. A., King, K. Y., and Baldrige, M. T. (2018). Mouse microbiota models: Comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Front. Physiol.* *9*, 1–16. doi:10.3389/fphys.2018.01534.
- Khoruts, A. (2018). Targeting the microbiome: From probiotics to fecal microbiota transplantation. *Genome Med.* *10*, 8–10. doi:10.1186/s13073-018-0592-8.
- Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J. G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H. S., et al. (2014). Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* *15*, 374–381. doi:10.1016/j.chom.2014.02.006.
- Kim, H. Y., Yang, J. O., and Ji, G. E. (2005). Effect of bifidobacteria on production of allergy-related cytokines from mouse spleen cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* *15*, 265–268.
- Kim, J. Y., Woo, H. J., Kim, Y. S., and Lee, H. J. (2002). Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Biotechnol. Lett.* *24*, 1431–1436. doi:10.1023/A:1019875204323.
- Kim, N., and Ji, G. E. (2006). Modulatory activity of Bifidobacterium sp. BGN4 cell fractions on immune cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* *16*, 584–589. doi:10.1007/11751649_64.
- Kim, S. J., Lee, H. H., Choi, W., Kang, C. H., Kim, G. H., and Cho, H. (2022). Anti-Tumor Effect of Heat-Killed Bifidobacterium bifidum on Human Gastric Cancer through Akt-p53-Dependent Mitochondrial Apoptosis in Xenograft Models. *Int. J. Mol. Sci.* *23*. doi:10.3390/ijms23179788.
- Kim, W. G., Kang, G. D., Kim, H. I., Han, M. J., and Kim, D. H. (2019). Bifidobacterium longum IM55 and Lactobacillus plantarum IM76 alleviate allergic rhinitis in mice by restoring Th2/Treg imbalance and gut microbiota disturbance. *Benef. Microbes* *10*, 55–67. doi:10.3920/BM2017.0146.
- Kim, W. J., Choi, I. S., Kim, C. S., Lee, J. H., and Kang, H. W. (2017). Relationship between serum IgA level and allergy/asthma. *Korean J. Intern. Med.* *32*, 137–145. doi:10.3904/kjim.2014.160.
- Klose, C. S. N., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* *17*, 765–774. doi:10.1038/ni.3489.
- Koba, M., Śmietana, M., Brzozowska, E., Ćorska, S., Janik, M., Mikulic, P., et al. (2016). Bacteriophage adhesin-coated long-period grating-based sensor: Bacteria detection specificity. *J. Light. Technol.* *34*, 4531–4536. doi:10.1109/JLT.2016.2532466.
- Kopečný, J., Mrázek, J., and Killer, J. (2010). The presence of bifidobacteria in social insects, fish and reptiles. *Folia Microbiol. (Praha)*. *55*, 336–339. doi:10.1007/s12223-010-0053-2.
- Krishnan, V., Chaurasia, P., and Kant, A. (2016). Pili in Probiotic Bacteria. *Probiotics Prebiotics Hum. Nutr. Heal.* doi:10.5772/63087.
- Kubinak, J. L., Petersen, C., Connell, R. M. O., Round, J. L., Kubinak, J. L., Petersen, C., et al. (2015). MyD88 Signaling in T Cells Directs IgA-Mediated Control of the Microbiota to Promote Health Article MyD88 Signaling in T Cells Directs IgA-Mediated Control of the Microbiota to Promote Health. *Cell Host Microbe* *17*, 153–163. doi:10.1016/j.chom.2014.12.009.
- Lathrop, S. K., Bloom, S. M., Rao, S. M., Nutsch, K., Lio, C. W., Santacruz, N., et al. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* *478*, 250–254. doi:10.1038/nature10434.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 171–184. doi:10.1038/nrmicro2297.
- Lee, I. C., Caggianiello, G., van Swam, I. I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P. A., et al. (2016). Strain-Specific Features of Extracellular Polysaccharides and Their Impact on Lactobacillus plantarum-Host Interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 3959–3970. doi:10.1128/AEM.00306-16.
- Lee, M. J., Zang, Z., Choi, E. Y., Shin, H. K., and Ji, G. E. (2002). Cytoskeleton reorganization and cytokine production of macrophages by Bifidobacterial cells and cell-free extracts. *J.*

- Microbiol. Biotechnol.* 12, 398–405.
- Lee, N., Lee, S., Jang, S. W., Shin, H. S., Park, J. H., Park, M. S., et al. (2021). Lysed and disrupted *Bifidobacterium bifidum* BGN4 cells promote anti-inflammatory activities in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 5115–5118. doi:10.1016/j.sjbs.2021.05.028.
- Lee, S. Y., Lee, B. H., Park, J. H., Park, M. S., Ji, G. E., and Sung, M. K. (2022). *Bifidobacterium bifidum* BGN4 Paraprobiotic Supplementation Alleviates Experimental Colitis by Maintaining Gut Barrier and Suppressing Nuclear Factor Kappa B Activation Signaling Molecules. *J. Med. Food* 25, 146–157. doi:10.1089/jmf.2021.K.0150.
- Lee, Y. M., and Kim, Y. J. (2022). Two cases of bacteremic pneumonia caused by *Bifidobacterium* species. *Anaerobe* 73, 102483. doi:10.1016/J.ANAEROBE.2021.102483.
- Leung, J. M., Graham, A. L., and Knowles, S. C. L. (2018). Parasite-microbiota interactions with the vertebrate gut: Synthesis through an ecological lens. *Front. Microbiol.* 9, 1–20. doi:10.3389/fmicb.2018.00843.
- Leuschner, R. G. K., Bew, J., Simpson, P., Ross, P. R., and Stanton, C. (2003). A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 161–170. doi:10.1016/S0168-1605(02)00365-3.
- Li-sheng, W., Ling-jia, P., Li, S., Yong, S., Ya-li, Z., and Dian-yuan, Z. (1999). The apoptosis of experimental colorectal carcinoma cells induced by peptidoglycan of *Bifidobacterium* and the expression of apoptotic regulating genes. *Chinese J. of Cancer Res.* 11, 184–187.
- Li, L., Fang, Z., Lee, Y. K., Zhao, J., Zhang, H., Lu, W., et al. (2020). Prophylactic effects of oral administration of: *Lactobacillus casei* on house dust mite-induced asthma in mice. *Food Funct.* 11, 9272–9284. doi:10.1039/d0fo01363c.
- Liang, H. E., Reinhardt, R. L., Bando, J. K., Sullivan, B. M., Ho, I. C., and Locksley, R. M. (2012). Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat. Immunol.* 13, 58–66. doi:10.1038/ni.2182.
- Liu, C., Zhang, X., Xiang, Y., Qu, X., Liu, H., Liu, C., et al. (2018). Role of epithelial chemokines in the pathogenesis of airway inflammation in asthma (Review). *Mol. Med. Rep.* 17, 6935–6941. doi:10.3892/mmr.2018.8739.
- Liu, H. N., Wu, H., Chen, Y. Z., Chen, Y. J., Shen, X. Z., and Liu, T. T. (2017). Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis.* 49, 331–337. doi:10.1016/J.DLD.2017.01.142.
- Loebermann, H., Tokuoka, R., Deisenhofer, J., and Huber, R. (1984). Human α 1-proteinase inhibitor: Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J. Mol. Biol.* 177, 531–557. doi:10.1016/0022-2836(84)90298-5.
- Lomer, M. C. E. (2015). Review article: The aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41, 262–275. doi:10.1111/apt.13041.
- López, P., Gueimonde, M., Margolles, A., and Suárez, A. (2010). Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 157–165. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.023.
- López, P., Monteserín, D. C., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Suárez, A., et al. (2012). Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. *Food Res. Int.* 46, 99–107. doi:10.1016/j.foodres.2011.11.020.
- Luck, B., Engevik, M. A., Ganesh, B. P., Lackey, E. P., Lin, T., Balderas, M., et al. (2020). *Bifidobacteria* shape host neural circuits during postnatal development by promoting synapse formation and microglial function. *Sci. Rep.* 10, 1–18. doi:10.1038/s41598-020-64173-3.
- Luck, B., Horvath, T. D., Engevik, K. A., Ruan, W., Haidacher, S. J., Hoch, K. M., et al. (2021). Neurotransmitter Profiles Are Altered in the Gut and Brain of Mice Mono-Associated with *Bifidobacterium dentium*. 11, 1091. doi:10.3390/biom11081091.
- Lugli, G. A., Milani, C., Duranti, S., Alessandri, G., Turrone, F., Mancabelli, L., et al. (2019).

- Isolation of novel gut bifidobacteria using a combination of metagenomic and cultivation approaches. *Genome Biol.* 20, 96. doi:10.1186/s13059-019-1711-6.
- Ma, H., Tao, W., and Zhu, S. (2019). T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 216–224. doi:10.1038/s41423-019-0208-2.
- Mackey, B. M. (2000). “Injured Bacteria,” in *Microbiological Safety and Quality of Food Vol I*, eds. B. M. Lund, A. Baird-Parker, and G. W. Gould (Aspen Publisher), 315–341. Available at: https://books.google.pl/books?id=Y10bxYHCfVvC&printsec=frontcover&hl=pl&source=gb_s_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false [Accessed May 19, 2023].
- Marra, F., Lynd, L., Coombes, M., Richardson, K., Legal, M., FitzGerald, J. M., et al. (2006). Does Antibiotic Exposure During Infancy Lead to Development of Asthma?: A Systematic Review and Metaanalysis. *Chest* 129, 610–618. doi:10.1378/CHEST.129.3.610.
- Martens, K., Boeck, I. De, Jokicevic, K., Kiekens, F., Farré, R., Vanderveken, O. M., et al. (2021). Lacticaseibacillus casei AMBR2 Restores Airway Epithelial Integrity in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Allergy, Asthma, Immunol. Res.* 13.
- Martinez, J. E., Kahana, D. D., Ghuman, S., Wilson, H. P., Wilson, J., Kim, S. C. J., et al. (2021). Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 12, 1–13. doi:10.3389/fendo.2021.667066.
- Martorell, P., Alvarez, B., Llopis, S., Navarro, V., Ortiz, P., Gonzalez, N., et al. (2021). Heat-treated bifidobacterium longum CECT-7347: A whole-cell postbiotic with antioxidant, anti-inflammatory, and gut-barrier protection properties. *Antioxidants* 10. doi:10.3390/antiox10040536.
- Mastrangeli, G., Corinti, S., Butteroni, C., Afferni, C., Bonura, A., Boirivant, M., et al. (2009). Effects of live and inactivated VSL#3 probiotic preparations in the modulation of in vitro and in vivo allergen-induced Th2 responses. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150, 133–143. doi:10.1159/000218116.
- Mateus, A., Bobonis, J., Kurzawa, N., Stein, F., Helm, D., Hevler, J., et al. (2018). Thermal proteome profiling in bacteria: probing protein state in vivo. *Mol. Syst. Biol.* 14, 1–15. doi:10.15252/msb.20188242.
- Matheu, M. P., Sen, D., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2008). Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging. *J. Vis. Exp.*, 3–5. doi:10.3791/773.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., and Benno, Y. (2004). H⁺-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 109–113. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2003.10.009.
- Matsuzaki, T., and Chin, J. (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* 78, 67–73. doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00887.x.
- Mattarelli, P., and Biavati, B. (2018). *Species in the Genus*. doi:10.1016/B978-0-12-805060-6/00002-8.
- Mattarelli, P., and Sgorbati, B. (2018). Chemotaxonomic Features in the Bifidobacteriaceae Family. *Bifidobact. Relat. Org.*, 99–114. doi:10.1016/B978-0-12-805060-6.00005-3.
- Mazmanian, S. K., Round, J. L., and Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620–625. doi:10.1038/NATURE07008.
- McCarville, J. L., Dong, J., Caminero, A., Bermudez-Brito, M., Jury, J., Murray, J. A., et al. (2017). A Commensal Bifidobacterium longum Strain Prevents Gluten-Related Immunopathology in Mice through Expression of a Serine Protease Inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e01323-17. doi:10.1128/AEM.01323-17.
- Medina, M., Izquierdo, E., Ennahar, S., and Sanz, Y. (2007). Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium longum strains: Relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin. Exp. Immunol.* 150, 531–538. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03522.x.
- Mendes-Ribeiro, A. C., Moss, M. B., Siqueira, M. A. S., Moraes, T. L., Ellory, J. C., Mann, G. E., et al. (2008). Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: An explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 1143–1146. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04970.x.

- Merly, L., and Smith, S. L. (2017). Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 39, 55–58. doi:10.1080/08923973.2017.1282511.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., et al. (2017a). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81, 1–67. doi:10.1128/mmbr.00036-17.
- Milani, C., Mangifesta, M., Mancabelli, L., Lugli, G. A., James, K., Duranti, S., et al. (2017b). Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *ISME J* 11. doi:10.1038/ismej.2017.138.
- Milani, C., Mangifesta, M., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Mancino, W., Viappiani, A., et al. (2017c). The sortase-dependent fimbriome of the genus *Bifidobacterium*: Extracellular structures with potential to modulate microbe-host dialogue. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. doi:10.1128/AEM.01295-17.
- Mkaouer, H., Akermi, N., Kriaa, A., Abraham, A. L., Jablaoui, A., Soussou, S., et al. (2019). Serine protease inhibitors and human wellbeing interplay: New insights for old friends. *PeerJ* 2019, 1–21. doi:10.7717/peerj.7224.
- Modesto, M., Checucci, A., and Mattarelli, P. (2021). “Identification of *Bifidobacteria* by the Phosphoketolase Assay BT - *Bifidobacteria*: Methods and Protocols,” in eds. D. van Sinderen and M. Ventura (New York, NY: Springer US), 141–148. doi:10.1007/978-1-0716-1274-3_12.
- Modesto, M., Watanabe, K., Arita, M., Satti, M., Oki, K., Sciavilla, P., et al. (2019). *Bifidobacterium jacchi* sp. nov., isolated from the faeces of a baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 2477–2485. doi:10.1099/ijsem.0.003518.
- Morath, S., Geyer, A., and Hartung, T. (2001). Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* 193, 393–397. doi:10.1084/jem.193.3.393.
- Moreira, L. O., and Zamboni, D. S. (2012). NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. *Front. Immunol.* 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00328.
- Morniroli, D., Vizzari, G., Consales, A., Mosca, F., and Lorella, M. (2021). Postbiotic Supplementation for Children and Newborn ’ s Health. 1–11.
- Motomura, Y., Morita, H., Moro, K., Nakae, S., Artis, D., Endo, T. A., et al. (2014). Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity* 40, 758–771. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.013.
- Mowad, C. M., Anderson, B., Scheinman, P., Pootongkam, S., Nedorost, S., and Brod, B. (2016). Allergic contact dermatitis: Patient diagnosis and evaluation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 74, 1029–1040. doi:10.1016/J.JAAD.2015.02.1139.
- Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watamabe, T., Yokokura, T., and Yo, M. (1994). Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1012–1017. doi:10.1248/cpb.37.3229.
- Nagaoka, M., Muto, M., Yokokura, T., and Mutai, M. (1988). Structure of 6-deoxytalose-containing polysaccharide from the cell wall of *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Biochem.* 103, 618–621. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122316.
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Sawada, H., et al. (1995). Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028. *Carbohydr. Res.* 274, 245–249. doi:10.1016/0008-6215(95)00076-6.
- Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S., and Mohammed, S. (2019). Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. *Microb. Pathog.* 132, 10–19. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.018.
- Newcomb, D. C., Boswell, M. G., Reiss, S., Zhou, W., Goleniewska, K., Toki, S., et al. (2013). IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation. *Thorax* 68, 717–723. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202404.
- Nguyen, H. T. T., Corry, J. E. L., and Miles, C. A. (2006). Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 908–913.

- doi:10.1128/AEM.72.1.908-913.2006.
- Nilsen, N. J., Deininger, S., Nonstad, U., Skjeldal, F., Husebye, H., Rodionov, D., et al. (2008). Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J. Leukoc. Biol.* 84, 280–291. doi:10.1189/jlb.0907656.
- Nogacka, A. M., Salazar, N., Arboleya, S., Suárez, M., Fernández, N., Solís, G., et al. (2018). Early microbiota, antibiotics and health. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 83–91. doi:10.1007/s00018-017-2670-2.
- Novakova, J., Vlkova, E., Salmonova, H., Pechar, R., Rada, V., and Kokoska, L. (2016). Anticlostridial agent 8-hydroxyquinoline improves the isolation of faecal bifidobacteria on modified Wilkins–Chalgren agar with mupirocin. *Lett. Appl. Microbiol.* 62, 330–335. doi:10.1111/lam.12552.
- Novik, G. I., Astapovich, N. I., Grzegorzewicz, A., and Gam'yan, A. (2005). Isolation and Comparative Analysis of Glycolipid Fractions in Bifidobacteria. *Microbiology* 74, 670–677. doi:10.1007/s11021-005-0122-8.
- Novik, G. I., Astapovich, N. I., Grzegorzewicz, A., and Gamian, A. (2006). Analysis of phospholipids in bifidobacteria. *Microbiology* 75, 29–34. doi:10.1134/S0026261706010061.
- O'Connell Motherway, M., Houston, A., O'Callaghan, G., Reunanen, J., O'Brien, F., O'Driscoll, T., et al. (2019). A Bifidobacterial pilus-associated protein promotes colonic epithelial proliferation. *Mol. Microbiol.* 111, 287–301. doi:10.1111/mmi.14155.
- O'Connell Motherway, M., Zomer, A., Leahy, S. C., Reunanen, J., Bottacini, F., Claesson, M. J., et al. (2011). Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11217–22. doi:10.1073/pnas.1105380108.
- O'Mahony, L., Mccarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., et al. (2005). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 128, 541–551. doi:10.1053/j.gastro.2004.11.050.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., and Siegel, R. M. (2019). “9 - Cytokines and Cytokine Receptors,” in *Clinical Immunology (Fifth Edition) Principles and Practice*, eds. R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, and C. M. B. T.-C. I. (Fifth E. Weyand (London: Elsevier), 127-155.e1. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0.
- Oerlemans, M. M. P., Akkerman, R., Ferrari, M., Walvoort, M. T. C., and de Vos, P. (2021). Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health. *J. Funct. Foods* 76, 104289. doi:10.1016/j.jff.2020.104289.
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., and Wetzler, L. M. (2012). The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol.* 3, 1–17. doi:10.3389/fimmu.2012.00079.
- Olm, M. R., Dahan, D., Carter, M. M., Merrill, B. D., Yu, F. B., Jain, S., et al. (2022). Robust variation in infant gut microbiome assembly across a spectrum of lifestyles. *Science (80-.).* 376, 1220–1223.
- Op Den Camp, H. J. M., Oosterhof, A., and Veerkamp, J. H. (1985). Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 47, 332–334.
- Östling, J., van Geest, M., Schofield, J. P. R., Jevnikar, Z., Wilson, S., Ward, J., et al. (2019). IL-17-high asthma with features of a psoriasis immunophenotype. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 1198–1213. doi:10.1016/j.jaci.2019.03.027.
- Otzen, D. E., Sehgal, P., and Nesgaard, L. W. (2007). Alternative membrane protein conformations in alcohols. *Biochemistry* 46, 4348–4359. doi:10.1021/bi700091r.
- Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821–832. doi:10.1038/nri3322.
- Pacyga-Prus, K., Jakubczyk, D., Sandström, C., Šrůtková, D., Pyclik, M. J., Leszczyńska, K., et al. (2023). Polysaccharide BAP1 of *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 is a biologically active molecule with immunomodulatory properties. *Carbohydr. Polym.* 315, 120980. doi:10.1016/j.carbpol.2023.120980.
- Park, S. Y., Ji, G. E., Ko, Y. T., Jung, H. K., Ustunol, Z., and Pestka, J. J. (1999). Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 231–241. doi:10.1016/S0168-1605(98)00197-4.

- Patangia, D. V., Anthony Ryan, C., Dempsey, E., Paul Ross, R., and Stanton, C. (2022). Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen* 11, 1–23. doi:10.1002/mbo3.1260.
- Paveljšek, D., Ivičak-Kocjan, K., Treven, P., Benčina, M., Jerala, R., and Rogelj, I. (2021). Distinctive probiotic features share common TLR2-dependent signalling in intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 23, 1–12. doi:10.1111/cmi.13264.
- Pellaton, C., Nutten, S., Thierry, A.-C., Boudousquié, C., Barbier, N., Blanchard, C., et al. (2012a). Intragastric and Intranasal Administration of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 Modulates Allergic Airway Inflammation in Mice. *Int. J. Inflam.* 2012, 1–8. doi:10.1155/2012/686739.
- Pellaton, C., Nutten, S., Thierry, A. C., Boudousquié, C., Barbier, N., Blanchard, C., et al. (2012b). Intragastric and intranasal administration of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 modulates allergic airway inflammation in mice. *Int. J. Inflam.* 2012. doi:10.1155/2012/686739.
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E., and Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 5, 1–19. doi:10.1186/s40168-017-0268-4.
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., and Rols, M. P. (2016). Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci. Rep.* 6, 1–8. doi:10.1038/srep19778.
- Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., et al. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 153, 448-459.e8. doi:10.1053/j.gastro.2017.05.003.
- Pipenbaher, N., Moeller, P. L., Dolinšek, J., Jakobsen, M., Weingartl, H., and Cencič, A. (2009). Nitric oxide (NO) production in mammalian non-tumorigenic epithelial cells of the small intestine and macrophages induced by individual strains of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Int. Dairy J.* 19, 166–171. doi:10.1016/j.idairyj.2008.09.003.
- Piyasena, P., Mohareb, E., and McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 207–216. doi:10.1016/S0168-1605(03)00075-8.
- Poaty Ditengou, J. I. C., Ahn, S.-I., Chae, B., and Choi, N.-J. (2023). Are heat-killed probiotics more effective than live ones on colon length shortness, disease activity index, and the histological score of an inflammatory bowel disease-induced murine model? A meta-analysis. *J. Appl. Microbiol.* 134. doi:10.1093/jambio/txad008.
- pod. red. Pawliczak, R. (2013). *Alergologia kompendium*.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., and Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* 6, 285–306. doi:10.1007/s12263-010-0206-6.
- Pollard, M., and Sharon, N. (1970). Responses of the Peyer’s Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation. *Infect. Immun.* 2, 96–100. doi:10.1128/iai.2.1.96-100.1970.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., and Johnson, G. T. eds. (2017). “Research Strategies,” in *Cell Biology* (Elsevier), 75–101. doi:10.1016/B978-0-323-34126-4.00006-2.
- Porfirio, S., Carlson, R. W., and Azadi, P. (2019). Elucidating Peptidoglycan Structure: An Analytical Toolset. *Trends Microbiol.* 27, 607–622. doi:10.1016/j.tim.2019.01.009.
- Poxton, I. R. (2015). Teichoic Acids, Lipoteichoic Acids and Other Secondary Cell Wall and Membrane Polysaccharides of Gram-Positive Bacteria. *Mol. Med. Microbiol.*, 91–103. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00005-6.
- Praet, J., Meeus, I., Cnockaert, M., Aerts, M., Smagghe, G., and Vandamme, P. (2015). *Bifidobacterium commune* sp. nov. isolated from the bumble bee gut. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107. doi:10.1007/s10482-015-0425-3.
- Priya, S., Burns, M. B., Ward, T., Mars, R. A. T., Adamowicz, B., Lock, E. F., et al. (2022). Identification of shared and disease-specific host gene-microbiome associations across human diseases using multi-omic integration. *Nat. Microbiol.* 7, 780–795. doi:10.1038/s41564-022-01121-z.
- Proft, T., and Baker, E. N. (2008). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria --- structure,

- assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 613. doi:10.1007/s00018-008-8477-4.
- Pucillo, C., Lorentz, A., Sharma, M., Saluja, R., Thangam, E. B., Jemima, E. A., et al. (2018). The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and inflammation: The Hunt for new Therapeutic Targets. *Front. Immunol.* 9, 1873. doi:10.3389/fimmu.2018.01873.
- Pyclik, M., Srutkova, D., Schwarzer, M., and Górska, S. (2020). Bifidobacteria cell wall-derived exo-polysaccharides, lipoteichoic acids, peptidoglycans, polar lipids and proteins – their chemical structure and biological attributes. *Int. J. Biol. Macromol.* 147. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.227.
- Quagliariello, A., Aloisio, I., Bozzi Cionci, N., Luiselli, D., D’Auria, G., Martinez-Priego, L., et al. (2016). Effect of Bifidobacterium breve on the Intestinal Microbiota of Coeliac Children on a Gluten Free Diet: A Pilot Study. *Nutrients* 8, 660. doi:10.3390/nu8100660.
- Raftis, E. J., Delday, M. I., Cowie, P., McCluskey, S. M., Singh, M. D., Ettorre, A., et al. (2018). Bifidobacterium breve MRx0004 protects against airway inflammation in a severe asthma model by suppressing both neutrophil and eosinophil lung infiltration. *Sci. Rep.* 8, 1–13. doi:10.1038/s41598-018-30448-z.
- Rawlins, E. L., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D. M., Auten, R. L., Hasegawa, H., et al. (2009). The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 4, 525–534. doi:10.1016/j.stem.2009.04.002.
- Ren, C., Zhang, Q., De Haan, B. J., Zhang, H., Faas, M. M., and De Vos, P. (2016). Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep34561.
- Rodriguez, B., Prioult, G., Bibiloni, R., Nicolis, I., Mercenier, A., Butel, M. J., et al. (2011). Germ-free status and altered caecal subdominant microbiota are associated with a high susceptibility to cow’s milk allergy in mice. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 133–144. doi:10.1111/J.1574-6941.2010.01035.X.
- Rook, G., Bäckhed, F., Levin, B. R., McFall-Ngai, M. J., and McLean, A. R. (2017). Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet* 390, 521–530. doi:10.1016/S0140-6736(17)30566-4.
- Rozman, V., Mohar Lorbeg, P., Accetto, T., and Bogovič Matijašić, B. (2020). Characterization of antimicrobial resistance in lactobacilli and bifidobacteria used as probiotics or starter cultures based on integration of phenotypic and in silico data. *Int. J. Food Microbiol.* 314, 108388. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108388.
- Ruas-Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 88, 843–856. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., and Salminen, S. (2006). Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–5. doi:10.4315/0362-028X-69.8.2011.
- Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Pérez, P. F., and Abraham, A. G. (2010). Exopolysaccharides produced by Lactobacillus and Bifidobacterium strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2079–2086. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04839.x.
- Ruiz, L., Gueimonde, M., Patricia, R. M., Ribbera, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Ventura, M., et al. (2012a). Molecular clues to understand the aerotolerance phenotype of Bifidobacterium animalis subsp. lactis. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 644–650. doi:10.1128/AEM.05455-11/ASSET/2C482738-6D5F-4298-A88E-34B13AE88A21/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991028680005.JPEG.
- Ruiz, L., O’connell-Motherway, M., Zomer, A., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., and Van Sinderen, D. (2012b). A bile-inducible membrane protein mediates bifidobacterial bile resistance bt_329 523..535. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00329.x.
- Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C. G., and Margolles, A. Cell envelope changes in Bifidobacterium animalis ssp. lactis as a response to bile. doi:10.1111/j.1574-

6968.2007.00854.x.

- Rutsch, A., Kantsjö, J. B., and Ronchi, F. (2020). The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology. *Front. Immunol.* 11, 1–24. doi:10.3389/fimmu.2020.604179.
- Sabater, C., Molinero-García, N., Castro-Bravo, N., Diez-Echave, P., Hidalgo-García, L., Delgado, S., et al. (2020). Exopolysaccharide Producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strains Modify the Intestinal Microbiota and the Plasmatic Cytokine Levels of BALB/c Mice According to the Type of Polymer Synthesized. *Front. Microbiol.* 11, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2020.601233.
- Sagar, S., Vos, A. P., Morgan, M. E., Garssen, J., Georgiou, N. A., Boon, L., et al. (2014). The combination of *Bifidobacterium breve* with non-digestible oligosaccharides suppresses airway inflammation in a murine model for chronic asthma. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 573–583. doi:10.1016/j.bbadis.2014.01.005.
- Saha, S., Jing, X., Park, S. Y., Wang, S., Li, X., Gupta, D., et al. (2010). Peptidoglycan recognition proteins protect mice from experimental colitis by promoting normal gut flora and preventing induction of interferon- γ . *Cell Host Microbe* 8, 147–162. doi:10.1016/j.chom.2010.07.005.Peptidoglycan.
- Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A. M., Ruas-Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilán, C. G. (2008). Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4737–45. doi:10.1128/AEM.00325-08.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de los Reyes-Gavilán, C. G., et al. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 92, 4158–4168. doi:10.3168/JDS.2009-2126.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 649–667. doi:10.1038/s41575-021-00440-6.
- Santos, S. S., Miranda, V. C., Trindade, L. M., Cardoso, V. N., Reis, D. C., Cassali, G. D., et al. (2021). *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 51A Attenuates Signs of Inflammation in a Murine Model of Food Allergy. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 63–73. doi:10.1007/s12602-021-09846-9.
- Saradna, A., Do, D. C., Kumar, S., Fu, Q.-L., and Gao, P. (2018). Macrophage Polarization and Allergic Asthma. *Transl Res.* 191, 1–14. doi:10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY.
- Sarate, P. J., Srutkova, D., Geissler, N., Schwarzer, M., Schabussova, I., Inic-Kanada, A., et al. (2021). Pre- and Neonatal Imprinting on Immunological Homeostasis and Epithelial Barrier Integrity by *Escherichia coli* Nissle 1917 Prevents Allergic Poly-Sensitization in Mice. *Front. Immunol.* 11, 1–13. doi:10.3389/fimmu.2020.612775.
- Sartorius, R., Trovato, M., Manco, R., D’Apice, L., and De Berardinis, P. (2021). Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines. *npj Vaccines* 6, 1–15. doi:10.1038/s41541-021-00391-8.
- Saturio, S., Nogacka, A. M., Suárez, M., Fernández, N., Mantecón, L., Mancabelli, L., et al. (2021). Early-life development of the bifidobacterial community in the infant gut. *Int. J. Mol. Sci.* 22. doi:10.3390/ijms22073382.
- Savage, J., Sicherer, S., and Wood, R. (2016). The Natural History of Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4, 196–203. doi:10.1016/j.jaip.2015.11.024.
- Scardovi, V., and Trovatelli, L. D. (1965). *The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus Bifidobacterium.*
- Schiavi, E., Gleinser, M., Molloy, E., Groeger, D., Frei, R., Ferstl, R., et al. (2016). The Surface-Associated Exopolysaccharide of *Bifidobacterium longum* 35624 Plays an Essential Role in Dampening Host Proinflammatory Responses and Repressing Local TH17 Responses. 82, 7185–7196. doi:10.1128/AEM.02238-16.Editor.
- Schleifer, K. H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407–477.

- Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Front. Immunol.* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00455.
- Schumann, P. (2011). Peptidoglycan Structure. *Methods Microbiol.* 38, 101–129. doi:10.1016/B978-0-12-387730-7.00005-X.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274, 17406–9. doi:10.1074/jbc.274.25.17406.
- Schwarzer, M., Hermanova, P., Srutkova, D., Goliás, J., Hudcovic, T., Zwicker, C., et al. (2019). Germ-free mice exhibit mast cells with impaired functionality and gut homing and do not develop food allergy. *Front. Immunol.* 10, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2019.00205.
- Schwarzer, M., Srutkova, D., Schabussova, I., Hudcovic, T., Akgün, J., Wiedermann, U., et al. (2013). Neonatal colonization of germ-free mice with *Bifidobacterium longum* prevents allergic sensitization to major birch pollen allergen Bet v 1. *Vaccine* 31, 5405–5412. doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.014.
- Sekine, K., Hashimoto, Y., Saito, M., Kuboyama, M., and Kawashima, T. (1985). A New Morphologically Characterized Cell Wall Preparation (Whole Peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a Higher Efficacy on the Regression of an Established Tumor in Mice. *Cancer Res.* 45, 1300–1307.
- Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., et al. (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18964–18969. doi:10.1073/pnas.0809584105.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., and Roy, N. C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* 2013. doi:10.1155/2013/237921.
- Shang, N., Xu, R., and Li, P. (2013). Structure characterization of an exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* RH. *Carbohydr. Polym.* 91, 128–134. doi:10.1016/J.CARBPOL.2012.08.012.
- Shreshtha, S., Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., and Singh, S. P. (2018). Nitric oxide: It's role in immunity. *J. Clin. Diagnostic Res.* 12, BE01–BE05. doi:10.7860/JCDR/2018/31817.11764.
- Siednienko, J., Halle, A., Nagpal, K., Golenbock, D. T., and Miggin, S. M. (2010). TLR3-mediated IFN- β gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur. J. Immunol.* 40, 3150–3160. doi:10.1002/eji.201040547.
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J. Appl. Microbiol.* 99, 493–501. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02648.x.
- Sirvan, B., Usta, M., Kizilkan, N., and Urganci, N. (2017). Are Synbiotics added to the Standard Therapy to eradicate *Helicobacter pylori* in Children Beneficial ? A Randomized Controlled Study. *Euroasian J. Hepato-Gastroenterology* 7, 17–22.
- Smeeckens, J. M., Johnson-Weaver, B. T., Hinton, A. L., Azcarate-Peril, M. A., Moran, T. P., Immormino, R. M., et al. (2021). Fecal IgA, Antigen Absorption, and Gut Microbiome Composition Are Associated With Food Antigen Sensitization in Genetically Susceptible Mice. *Front. Immunol.* 11, 1–13. doi:10.3389/fimmu.2020.599637.
- Smelt, J. P. P. M., and Brul, S. (2014). Thermal Inactivation of Microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 1371–1385. doi:10.1080/10408398.2011.637645.
- Soh, W. T., Zhang, J., Hollenberg, M. D., Vliagoftis, H., Rothenberg, M. E., Sokol, C. L., et al. (2023). Protease allergens as initiators–regulators of allergic inflammation. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 1148–1168. doi:10.1111/all.15678.
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 133–159. doi:10.1093/femsre/fuv008.
- Spacova, I., Petrova, M. I., Fremau, A., Pollaris, L., Vanoirbeek, J., Ceuppens, J. L., et al. (2019). Intranasal administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents birch pollen-induced allergic asthma in a murine model. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 100–110. doi:10.1111/all.13502.

- Spacova, I., Van Beeck, W., Seys, S., Devos, F., Vanoirbeek, J., Vanderleyden, J., et al. (2020). Lactobacillus rhamnosus probiotic prevents airway function deterioration and promotes gut microbiome resilience in a murine asthma model. *Gut Microbes* 11, 1729–1744. doi:10.1080/19490976.2020.1766345.
- Spaiser, S. J., Culpepper, T., Nieves, C., Ukhanova, M., Mai, V., Percival, S. S., et al. (2015). Lactobacillus gasseri KS-13, Bifidobacterium bifidum G9-1, and Bifidobacterium longum MM-2 Ingestion Induces a Less Inflammatory Cytokine Profile and a Potentially Beneficial Shift in Gut Microbiota in Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2014.983249> 34, 459–469. doi:10.1080/07315724.2014.983249.
- Speciale, I., Verma, R., Di Lorenzo, F., Molinaro, A., Im, S.-H., and De Castro, C. (2019). Bifidobacterium bifidum presents on the cell surface a complex mixture of glucans and galactans with different immunological properties. *Carbohydr. Polym.* ?, ?
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., et al. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043–1047. doi:10.1099/00207713-52-3-1043.
- Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S. K., et al. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13145–13150. doi:10.1073/pnas.1412008111.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.
- Sugita, K., Steer, C. A., Martinez-Gonzalez, I., Altunbulakli, C., Morita, H., Castro-Giner, F., et al. (2018). Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 300-310.e11. doi:10.1016/j.jaci.2017.02.038.
- Sun, Q., Jia, Q., Song, L., and Duan, L. (2019). Alterations in fecal short-chain fatty acids in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Med. (United States)* 98. doi:10.1097/MD.00000000000014513.
- Suzuki, T. A., and Ley, R. E. (2020). The role of the microbiota in human genetic adaptation. *Science (80-.)*. 370. doi:10.1126/science.aaz6827.
- Symonds, E. L., O'Mahony, C., Laphorne, S., O'Mahony, D., Sharry, J. Mac, O'Mahony, L., et al. (2012). Bifidobacterium infantis 35624 protects against salmonella-induced reductions in digestive enzyme activity in mice by attenuation of the host inflammatory response. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 3. doi:10.1038/CTG.2012.9.
- Szajewska, H., Kołodziej, M., Skórka, A., and Pieścik-Lech, M. (2022). Infant Formulas With Postbiotics: An Updated Systematic Review. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 74, 823–829. doi:10.1097/MPG.0000000000003441.
- Taddese, R., Belzer, C., Aalvink, S., de Jonge, M. I., Nagtegaal, I. D., Dutilh, B. E., et al. (2021). Production of inactivated gram-positive and gram-negative species with preserved cellular morphology and integrity. *J. Microbiol. Methods* 184, 106208. doi:10.1016/j.mimet.2021.106208.
- Taddese, R., Belzer, C., Aalvink, S., Jonge, M. I. de, Nagtegaal, I. D., Dutilh, B. E., et al. (2018). Bacterial Zombies And Ghosts: Production Of Inactivated Gram-Positive And Gram-Negative Species With Preserved Cellular Morphology And Cytoplasmic Content. *bioRxiv*, 458158. doi:10.1101/458158.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., et al. (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* 11, 443–451. doi:10.1016/S1074-7613(00)80119-3.
- Taverniti, V., and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 6, 261–274. doi:10.1007/s12263-011-0218-x.
- Taylor, R. C., Richmond, P., and Upham, J. W. (2006). Toll-like receptor 2 ligands inhibit T H2 responses to mite allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1148–1154. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.014.

- Telford, J. L., Barocchi, M. A., Margarit, I., Rappuoli, R., and Grandi, G. (2006). Pili in Gram-positive pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 509–519. doi:10.1038/nrmicro1443.
- Timmer, M. S. M., Sauvageau, J., Foster, A. J., Ryan, J., Lagutin, K., Shaw, O., et al. (2014). Discovery of lipids from *B. longum* subsp. *infantis* using whole cell MALDI analysis. *J. Org. Chem.* 79, 7332–7341. doi:10.1021/jo501016c.
- Tissier, H. (1899). Le bacterium coli et la reaction chromophile d'escherich. *Crit. Rev. Soc. Biol* 51, 943–945.
- Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique). *M.D. Thesis*. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1748-5908-8-2.
- Toki, S., Goleniewska, K., Zhang, J., Zhou, W., Newcomb, D. C., Zhou, B., et al. (2020). TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 75, 1606–1617. doi:10.1111/all.14196.
- Tomich, M., Planet, P. J., and Figurski, D. H. (2007). The tad locus: Postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 363–375. doi:10.1038/nrmicro1636.
- Torres-Maravilla, E., Holowacz, S., Delannoy, J., Lenoir, L., Jacouton, E., Gervason, S., et al. (2022). Serpin-positive *Bifidobacterium breve* CNCM I-5644 improves intestinal permeability in two models of irritable bowel syndrome. *Sci. Rep.* 12, 1–14. doi:10.1038/s41598-022-21746-8.
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J. F., Maillet, I., Akira, S., et al. (2004). Toll-Like Receptor 2 Is Required for Optimal Control of *Listeria monocytogenes* Infection. *Infect. Immun.* 72, 2131–2139. doi:10.1128/IAI.72.4.2131-2139.2004.
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M.-A., Werts, C., et al. (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5, 1000–1006. doi:10.1038/sj.embor.7400248.
- Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Ferrario, C., Lugli, G. A., Mancabelli, L., et al. (2017). Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1–16. doi:10.1007/s00018-017-2672-0.
- Turroni, F., Milani, C., Ventura, M., and van Sinderen, D. (2022). The human gut microbiota during the initial stages of life: insights from bifidobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 73, 81–87. doi:10.1016/j.copbio.2021.07.012.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., et al. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One* 7, 20–24. doi:10.1371/journal.pone.0036957.
- Turroni, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O'Connell Motherway, M., Taverniti, V., et al. (2013). Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11151–11156. doi:10.1073/pnas.1303897110.
- Ukena, S. N., Westendorf, A. M., Hansen, W., Rohde, M., Geffers, R., Coldewey, S., et al. (2005). The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med. Genet.* 6, 1–13. doi:10.1186/1471-2350-6-43.
- Valueva, O. A., Shashkov, A. S., Zdorovenko, E. L., Chizhov, A. O., Kiseleva, E., Novik, G., et al. (2013). Structures of cell-wall phosphate-containing glycopolymers of *Bifidobacterium longum* BIM B-476-D. *Carbohydr. Res.* 373, 22–27. doi:10.1016/j.carres.2013.03.006.
- Veerkamp, J. H. (1971). The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 204–211. doi:10.1016/0003-9861(71)90200-1.
- Veerkamp, J. H. (1972). Biochemical changes in *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus* after cell wall inhibition V. structure of the galactosyldiglycerides. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 273, 359–367. doi:10.1016/0304-4165(72)90227-9.
- Vemuri, R., Shinde, T., Shastri, M. D., Perera, A. P., Tristram, S., Martoni, C. J., et al. (2018). A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. *Int. J. Med. Sci.* 15, 840–848. doi:10.7150/ijms.25004.

- Ventura, M., Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., and Zink, R. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86. doi:10.1023/B:ANTO.0000047930.11029.ec.
- Ventura, M., Turrone, F., Motherway, M. O. C., MacSharry, J., and van Sinderen, D. (2012). Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol.* 20, 467–476. doi:10.1016/j.tim.2012.07.002.
- Verma, R., Lee, C., Jeun, E.-J., Yi, J., Kim, K. S., Ghosh, A., et al. (2018a). Cell surface polysaccharides of *Bifidobacterium bifidum* induce the generation of Foxp3+ regulatory T cells. *Sci. Immunol.* 3. Available at: <http://immunology.sciencemag.org/content/3/28/eaat6975.abstract>.
- Verma, R., Lee, C., Jeun, E. J., Yi, J., Kim, K. S., Ghosh, A., et al. (2018b). Cell surface polysaccharides of *Bifidobacterium bifidum* induce the generation of Foxp3+ regulatory T cells. *Sci. Immunol.* 3. doi:10.1126/sciimmunol.aat6975.
- Vichai, V., and Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112–1116. doi:10.1038/nprot.2006.179.
- Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 149–167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
- Wallimann, A., Hildebrand, M., Groeger, D., Stanic, B., Akdis, C. A., Zeiter, S., et al. (2021). An Exopolysaccharide Produced by *Bifidobacterium longum* 35624® Inhibits Osteoclast Formation via a TLR2-Dependent Mechanism. *Calcif. Tissue Int.* 108, 654–666. doi:10.1007/S00223-020-00790-4/FIGURES/6.
- Wang, L. S., Zhu, H. M., Zhou, D. Y., Wang, Y. L., and Zhang, W. D. (2001). Influence of whole peptidoglycan of bifidobacterium on cytotoxic effectors produced by mouse peritoneal macrophages. *World J. Gastroenterol.* 7, 440–443. doi:10.3748/wjg.v7.i3.440.
- Ware, B. R., and Flygare, W. H. (1972). Light scattering in mixtures of BSA, BSA dimers, and fibrinogen under the influence of electric fields. *J. Colloid Interface Sci.* 39, 670–675. doi:10.1016/0021-9797(72)90075-6.
- Watanabe, K., Makino, H., Sasamoto, M., Kudo, Y., Fujimoto, J., and Demberel, S. (2009). *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1535–1540. doi:10.1099/ijms.0.006247-0.
- Weber, E., Reynaud, Q., Suy, F., Gagneux-Brunon, A., Carricajo, A., Guillot, A., et al. (2015). *Bifidobacterium* Species Bacteremia: Risk factors in adults and infants. *Clin. Infect. Dis.* 61, 482–484.
- Wei, Y., Gao, J., Liu, D., Li, Y., and Liu, W. (2019). Adaptational changes in physiological and transcriptional responses of *Bifidobacterium longum* involved in acid stress resistance after successive batch cultures. *Microb. Cell Fact.* 18, 1–10. doi:10.1186/S12934-019-1206-X/FIGURES/5.
- Weiss, G., Christensen, H. R., Zeuthen, L. H., Vogensen, F. K., Jakobsen, M., and Frøkiær, H. (2011). Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon- β profiles in dendritic cells. *Cytokine* 56, 520–530. doi:10.1016/j.cyto.2011.07.024.
- Weiss, J. E., and Rettger, L. F. (1938). Taxonomic Relationships of *Lactobacillus Bifidus* (B. *Bifidus* Tissier) and *Bacteroides Bifidus*. *J. Infect. Dis.* 62, 115–120. doi:10.1093/infdis/62.1.115.
- Wheeler, R., Chevalier, G., Eberl, G., and Gomperts Boneca, I. (2014). The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology. *Cell. Microbiol.* 16, 1014–1023. doi:10.1111/cmi.12304.
- Wolf, A. J., Reyes, C. N., Liang, W., Becker, C., Shimada, K., Wheeler, M. L., et al. (2016). Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* 166, 624–636. doi:10.1016/j.cell.2016.05.076.
- Wolf, A. J., and Underhill, D. M. (2018a). Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 243–254. doi:10.1038/nri.2017.136.
- Wolf, A. J., and Underhill, D. M. (2018b). Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 243–254. doi:10.1038/nri.2017.136.
- Wrzyszczyk, M. (Katedra i K. C. W. i A. A. we W., and Mazur, K. (Wojewódzka P. A. we W.

- (1997). Epidemiologia chorób alergicznych : alergiczne choroby skóry, alergia na leki, alergia pokarmowa, alergia na jad owadów żądających. *Alerg. Astma Immunol.* 2, 129–135.
- Wu, J., Cui, S., Tang, X., Zhang, Q., Jin, Y., Zhao, J., et al. (2023). Bifidobacterium longum CCFM1206 Promotes the Biotransformation of Glucoraphanin to Sulforaphane That Contributes to Amelioration of Dextran-Sulfate-Sodium-Induced Colitis in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 71, 1100–1112. doi:10.1021/acs.jafc.2c07090.
- Wu, X., Han, J., Gong, G., Koffas, M. A. G., and Zha, J. (2021). Wall teichoic acids: Physiology and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 45, 1–23. doi:10.1093/femsre/fuaa064.
- Xie, N., Wang, Y., Wang, Q., Li, F., and Guo, B. (2012). Lipoteichoic acid of Bifidobacterium in combination with 5-fluorouracil inhibit tumor growth and relieve the immunosuppression. *Bull. Cancer* 99, E55–E63. doi:10.1684/BDC.2012.1571.
- Xu, F., Wang, J., Guo, Y., Fu, P., Zeng, H., Li, Z., et al. (2018). Antibiotic resistance, biochemical typing, and PFGE typing of Bifidobacterium strains commonly used in probiotic health foods. *Food Sci. Biotechnol.* 27, 467–477. doi:10.1007/s10068-018-0320-6.
- Xu, Q., Zhai, Z., An, H., Yang, Y., Yin, J., Wang, G., et al. (2019). The MarR family regulator BmrR is involved in bile tolerance of Bifidobacterium longum BBMN68 via controlling the expression of an ABC transporter. *Appl. Environ. Microbiol.* 85. doi:10.1128/AEM.02453-18/SUPPL_FILE/AEM.02453-18-S0001.PDF.
- Xu, R., Shen, Q., Wu, R., and Li, P. (2017). Food and Agricultural Immunology Structural analysis and mucosal immune regulation of exopolysaccharide fraction from Bifidobacterium animalis RH. doi:10.1080/09540105.2017.1333578.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486. doi:10.1038/nature11053.
- Yoshida, Y., Seki, T., Matsunaka, H., Watanabe, T., Shindo, M., Yamada, N., et al. (2010). Clinical effects of probiotic bifidobacterium breve supplementation in adult patients with atopic dermatitis. *Yonago Acta Med.* 53, 37–45.
- Yu, W., Freeland, D. M. H., and Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 16, 751–765. doi:10.1038/nri.2016.111.Food.
- Zabel, B. E., Gerdes, S., Evans, K. C., Nedveck, D., Singles, S. K., Volk, B., et al. (2020). Strain-specific strategies of 2'-fucosyllactose, 3-fucosyllactose, and difucosyllactose assimilation by Bifidobacterium longum subsp. infantis Bi-26 and ATCC 15697. *Sci. Reports 2020* 10 10, 1–18. doi:10.1038/s41598-020-72792-z.
- Zabłocka, A., Jakubczyk, D., Leszczyńska, K., Pacyga-Prus, K., Macała, J., and Górska, S. (2023). Studies of the Impact of the Bifidobacterium Species on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production in Murine Macrophages of the BMDM Cell Line. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* doi:10.1007/s12602-023-10093-3.
- Zakis, D. R., Paulissen, E., Kornete, L., Kaan, A. M. (Marije.), Nicu, E. A., and Zaura, E. (2022). The evidence for placental microbiome and its composition in healthy pregnancies: A systematic review. *J. Reprod. Immunol.* 149, 103455. doi:10.1016/j.jri.2021.103455.
- Zanotti, I., Turroni, F., Piemontese, A., Mancabelli, L., Milani, C., Viappiani, A., et al. (2015). Evidence for cholesterol-lowering activity by Bifidobacterium bifidum PRL2010 through gut microbiota modulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6813–6829. doi:10.1007/s00253-015-6564-7.
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., and da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Curr. Opin. Food Sci.* 32, 103–123. doi:10.1016/j.cofs.2020.03.009.
- Zeng, B., Shi, S., Ashworth, G., Dong, C., Liu, J., and Xing, F. (2019). ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Dis.* 10. doi:10.1038/s41419-019-1540-2.
- Zeuthen, L. H., Fink, L. N., and Frøkiær, H. (2008). Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology* 124, 489–502. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02800.x.

- Zhang, X., Qi, C., Guo, Y., Zhou, W., and Zhang, Y. (2016a). Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models. *Carbohydr. Polym.* 149, 186–206. doi:10.1016/J.CARBPOL.2016.04.097.
- Zhang, Z., Li, J., Zheng, W., Zhao, G., Zhang, H., Wang, X., et al. (2016b). Peripheral lymphoid volume expansion and maintenance are controlled by gut microbiota via RALDH+ dendritic cells. *Imm* 44, 330–342. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.004.Peripheral.
- Zhao, Q., and Elson, C. O. (2018). Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology* 154, 28–37. doi:10.1111/imm.12896.
- Zhu, J., Zhao, L., Guo, H., Jiang, L., and Ren, F. (2011). Immunomodulatory effects of novel bifidobacterium and lactobacillus strains on murine macrophage cells. *African J. Microbiol. Res.* 5, 8–15. doi:10.5897/AJMR10.589.
- Zuo, F. L., Yu, R., Khaskheli, G. B., Ma, H. Q., Chen, L. L., Zeng, Z., et al. (2014). Homologous overexpression of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (ahpC) protects *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 from oxidative stress. *Res. Microbiol.* 165, 581–589. doi:10.1016/J.RESMIC.2014.05.040.

12 SPIS RYCIN

Rycina 1 Zestawienie związków wywołujących odpowiedź immunologiczną organizmu u pacjentów chorych na alergię. Dane uzyskane na podstawie ankiety przeprowadzonej wśród obywateli USA, zebranej w 2021 przez J. Elfein (https://www.statista.com/statistics/1243167/common-allergies-us/).....	21
Rycina 2 Graficzne przedstawienie reakcji alergicznej zachodzącej w miejscu kontaktu z alergenem oraz w węzłach chłonnych (Biorender.com)	23
Rycina 3 Układ pokarmowy myszy germ-free i konwencjonalnej. (A) Mysz hodowana w warunkach germ-free na znacznie mniejszą wątrobę oraz ilość tłuszczu, ponadto znacznie powiększone jelito ślepe (B) mysz hodowana w warunkach kontrolnych na normalną wielkość wątroby i poziom tłuszczu	26
Rycina 4 Zestawienie scharakteryzowanych szczepów <i>Bifidobacterium</i> opisanych w literaturze (Alessandri et al., 2021)	31
Rycina 5 Schemat ściany komórkowej szczepów <i>Bifidobacterium</i> wraz z antygenami powierzchniowymi obecnymi na jej powierzchni (Pyclik et al., 2020)	38
Rycina 6 Dwa typy budowy peptydoglikanu scharakteryzowane w bakteriach. Łańcuch peptydowy złożony jest z podjednostek (zaczynając od wiązania z MurNAc) L-Ala – D-Glu –L-Lys/L-Orn-D-Ala-(D-Ala) (Schleifer and Kandler, 1972).	39
Rycina 7 Schemat eksperymentu – myszy model alergii wziewnej indukowanej owoalbuminą (OVA). 6-8-tygodniowe samice myszy Balb/c (n = 6-8) były dootrzewnowo immunizowane 10 µg OVA + soli aluminium (Alum) w dniu 1 i 14 eksperymentu, dawkę przypominającą 15 µg OVA + soli aluminium podano w dniu 21. Siedem dni po trzeciej immunizacji rozpoczęto ekspozycję myszy na 100 µg OVA przez 4 kolejne dni. Żywe (UN Bl 7952) bądź poddane obróbce termicznej (HT Bl 7952) bifidobakterie w dawce 1×10^7 CFU/30 µl lub PBS podawano donosowo 4 godziny przed podaniem OVA. Myszy uśmiercono w 32 dniu eksperymentu (BioRender.com).	62
Rycina 8 Inaktywacja termiczna w temperaturze 65 °C zmienia strukturę powierzchni bifidobakterii. Obrazy LV-SEM (A) żywych i (B) termicznie inaktywowanych komórek Bl 7952 oraz (C) żywych i (D) termicznie inaktywowanych komórek Bad 373, (E) żywych i (F) termicznie inaktywowanych komórek Bad 370. Skala (1 µm) dotyczy wszystkich prezentowanych obrazów.	70
Rycina 9 Różnice fizykochemiczne między żywymi i termicznie inaktywowanymi bifidobakteriami. Pomiar wielkości (µm) i potencjału zeta (mV) nietraktowanych (niebieskie słupki) i poddanych inaktywacji termicznej (pomarańczowe słupki) szczepów bifidobakterii wykonanych przy użyciu Zetasizer Nano ZS. Dane przedstawiono jako	

średnią \pm SEM z 5 pomiarów; różnice statystyczne analizowano za pomocą testu t-Studenta między żywymi a termicznie inaktywowanymi, * różnica istotna statystycznie $p < 0,05$ 71

Rycina 10 Ocena cytotoxyczności badanych szczepów *Bifidobacterium* z wykorzystaniem linii makrofagów/monocytów RAW 264.7. Komórki stymulowano nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami przez 18 godzin. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną $1 \mu\text{g/ml}$ LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Bezpośrednim wyznacznikiem ilości żywych komórek jest ilość białek, które związały się z sulforodaminą B. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test Dunetta 2 way-ANOVA wykonano w odniesieniu do komórek niestymulowanych, # $p < 0,05$ 73

Rycina 11 Oznaczenie poziomu azotynów (NO_2^-) w nadsączach pochodzących z linii RAW 264.7. Komórki stymulowano nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami przez 18 godzin. Do wykonania testu Greiss wykorzystano tylko świeżo zebrany nadsącz. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną $1 \mu\text{g/ml}$ LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$,. Test Dunetta 2 way-ANOVA wykonano w odniesieniu do komórek niestymulowanych, istotne statystycznie #..... 74

Rycina 12 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na wytwarzanie cytokin przez linię makrofagów RAW 264.7. Poziom (A) IL-10 i (B) TNF- α w nadsączach komórek został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną $1 \mu\text{g/ml}$ LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie $> \#$ 75

Rycina 13 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na linię makrofagów pochodzących ze szpiku kostnego iBMDM. Poziom (A) IL-10, (B) MCP-1 w nadsączach komórek został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi

(pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 µg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie >#. 76

Rycina 14 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na linię makrofagów płucnych MH-S. Poziom (A) IL-6, (B) TNF-α i (C) GM-CSF w nadsączach komórkach został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 lub 72 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 µg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami * p<0,05, *** p<0,001, analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie >#. 77

Rycina 15 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na komórki nabłonka płucnego TC-1 w warunkach in vitro. Poziom (A) IL-6, (B) MCP-1 i (C) GM-CSF w nadsączach komórkowych linii TC-1 został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 lub 72 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 µg/ml LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * p<0,05, *** p<0,001; analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie >#. ... 79

Rycina 16 Pochłanianie bifidobakterii na komórki nabłonka, a następnie ich transfer do komórek immunologicznych. (A) Pochłanianie nietraktowanych (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanych (pomarańczowe słupki) komórek bakteryjnych przez komórki linii nabłonka płucnego TC-1 i (B) transfer komórek pochłoniętych przez komórkami nabłonka, do komórek dendrytycznych JAWS II, (C) badanie korelacji Pearsona pomiędzy przekazywaniem i pochłanianiem bakterii Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Analiza porównawcza

- została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * $p < 0,05$ 81
- Rycina 17 Wpływ nietraktowanych i termicznie inaktywowanych szczepów bifidobakterii na komórki prezentujące antygen w warunkach *in vitro*. Poziom (A) IL-10 i (B) IL-12p70 w nadsączach komórkowych komórek dendrytycznych BMDC został zmierzony za pomocą testu ELISA po 20 godzinnej stymulacji z nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Kontrolą negatywną był PBS, a pozytywną 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS O111:B4, które podano w tej samej objętości co bakterie. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; analizę między kontrolą negatywną, a bakteriami wykonano na podstawie testu Dunetta 2-way ANOVA, wyniki istotne statystycznie $> \#$ 82
- Rycina 18 Wpływ podania bifidobakterii na aktywację receptorów hTLR2 i hNOD2. Poziom cytokiny IL-8 posłużył jako wskaźnik aktywacji receptorów. Komórki stymulowano nietraktowanymi (niebieskie słupki) i termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami przez 16 godzin. Jako kontrole pozytywne zastosowano ligand TLR2 Pam3CSK4 (1 $\mu\text{g/ml}$) i ligand NOD2 dipeptyd muramyłowy (MDP; 100 ng/ml), PBS został wykorzystany jako kontrola negatywna. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia \pm SEM. Analiza porównawcza została wykonana na podstawie test t-Studenta pomiędzy nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami, statystycznie istotna różnica * * $p < 0,01$ 84
- Rycina 19 Nietraktowane i termicznie inaktywowane szczepy bifidobakterii wpływają na produkcję cytokin indukowanych podaniem OVA w hodowlach splenocytów pobranych z myszy uwrażliwionych na OVA. Poziom cytokin (A) IL-5, (B) IL-4, (C) IL-13, (D) IFN- γ , (E) IL-6 i (F) IL-10 oznaczono po 72 godzinnej stymulacji OVA oraz nietaktowanymi (niebieskie słupki) lub termicznie inaktywowanymi (pomarańczowe słupki) bakteriami. Komórki stymulowane PBS posłużyły jako kontrola negatywna. Poziom cytokin oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Wartości zebrano z dwóch niezależnych eksperymentów. Różnice między nietraktowanymi i termicznie inaktywowanymi bakteriami zbadano za pomocą testu t-Studenta (* $p < 0.05$). Porównanie między grupą, której podano tylko OVA, a grupami z OVA i bakteriami przebadano za pomocą testu ANOVA Dunett'a # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ 85
- Rycina 20 Donosowe podanie nietraktowanych i termicznie inaktywowanych bakterii BI 7952 osłabia odpowiedź immunologiczną wywołaną przez owoalbuminę. Poziom cytokin (A) IL-5, (B) IL-4, (C) IL-13, (D) IFN- γ , (E) IL-6 i (F) IL-10 oznaczono po 72 godzinnej stymulacji OVA w grupach myszy przyjmujących nietraktowane (UN BI 7952/OVA,

niebieskie słupki), inaktywowane (HT B1 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterie lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki). Poziom cytokin oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ 87

Rycina 21 Donosowe podanie nietraktowanych i termicznie inaktywowanych bakterii B1 7952 wpływa na produkcję przeciwciał w mysim modelu uczulenia na OVA. Oznaczono poziom przeciwciał skierowanych przeciwko OVA: (A) IgE, (B) IgG1, (C) IgG2 i (D) IgA, (E) całkowity poziom IgA, oraz (F) specyficznych IgA skierowanych przeciw B1 7952. Wpływ nietraktowanych (UN B1 7952/OVA, niebieskie słupki), inaktywowanych (HT B1 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterii lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki) określono na podstawie poziomu przeciwciał znajdujących się w surowicy krwi obwodowej. Do oznaczenia poziomów przeciwciał próbki rozcieńczono 1:810 dla komórek RBL, 1:10 000 dla IgG1, 1:100 dla IgG2a i 1:10 dla IgA. Do oznaczenia poziomu przeciwciał IgA specyficznych względem nietraktowanych (UN) i termicznie inaktywowanych (HT) B1 7952 surowicę rozcieńczono dwukrotnie. Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ 88

Rycina 22 Donosowe podawanie nietraktowanego i termicznie inaktywowanego B1 7952 moduluje profil cytokinowy w alergicznym zapaleniu płuc myszy uczulonych na OVA. Wpływ nietraktowanych (UN B1 7952/OVA, niebieskie słupki), inaktywowanych (HT B1 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterii lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki) określono na podstawie poziomu cytokin w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym. Poziom cytokin oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ 89

Rycina 23 Donosowe podawanie nietraktowanego i termicznie inaktywowanego B1 7952 w różny sposób zmniejsza zapalenie alergiczne w płucach myszy uczulonych na OVA. (A) Zbadano skrawki tkanki płucnej barwione kwasem nadjodowym-Schiffa myszy, które przyjmowały nietraktowane (UN B1 7952/OVA, niebieskie słupki) i inaktywowane (HT B1 7952/OVA, pomarańczowe słupki) bakterie lub PBS (PBS/OVA, czarne słupki). (B) Próbki zostały

poddane ocenie histopatologicznej przez dwóch niezależnych ekspertów. (C) Zliczono całkowitą ilość komórek immunologicznych obecnych w BALF. (D, E, F i G) Określono poziomy przeciwciał znajdujących się w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym. Do oznaczenia poziomów przeciwciał próbki nie rozcieńczano dla komórek RBL i nierozcieńczonych dla IgA. Do oznaczenia poziomu przeciwciał IgA specyficznych względem nietraktowanych (UN) i termicznie inaktywowanych (HT) B1 7952 BALF rozcieńczono dwukrotnie. Wartości są wyrażone jako wykres pudełkowy ze słupkami wartości średniej i minimalnej do maksymalnej; każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Istotną różnicę między grupami doświadczalnymi otrzymującymi PBS/OVA i traktowanymi bifidobakteriami/OVA obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett *p <0,05. **p < 0,01..... 91

Rycina 24 Wpływ wybranych antygenów B1 7952 na komórki nabłonka płucnego TC-1 w warunkach in vitro. Poziom (A) IL-6 i (B) MCP-1 w nadsączach komórkowych linii TC-1 został zmierzony za pomocą testu ELISA po 18 godzinnej stymulacji z antygenami w stężeniach 10 µg/ml dla LTA lub peptydoglikanu i 30 µg/ml dla polisacharydów. Kontrolą negatywną był PBS. Eksperyment został wykonany trzykrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA Dunnett 93

Rycina 25 Wpływ antygenów powierzchniowych B1 7952 na komórki prezentujące antygen w warunkach in vitro. Poziom (A) IL-10, (B) IL-12p70(C) IL-6 i (D) TNF-α w nadsączach komórkowych komórek dendrytycznych BMDC został zmierzony za pomocą testu ELISA po 20 godzinnej stymulacji z wybranymi antygenami w stężeniach: 10 µg/ml dla LTA lub peptydoglikanu i 30 µg/ml dla polisacharydów. Kontrolą negatywną był PBS. Eksperyment został wykonany czterokrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA 94

Rycina 26 Wpływ podania wybranych antygenów powierzchniowych na produkcję cytokin w hodowlach splenocytów pobranych z naiwnych myszy. Komórki były traktowane przez 72 godziny antygenami powierzchniowymi o stężeniach 10 µg/ml LTA lub peptydoglikanu i 30 µg/ml polisacharydów. Komórki stymulowane PBS posłużyły jako kontrola negatywna. Poziom cytokin (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IFN-γ oznaczono z wykorzystaniem Luminexu 2000 (BioRad, USA). Eksperyment został wykonany na czterech myszach, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA 95

Rycina 27 Wpływ podania wybranych antygenów powierzchniowych na aktywację receptorów hTLR2 i hNOD2. Badanie kolorymetryczne przy długości fali 630 nm posłużył jako wskaźnik aktywacji receptorów (A) hTLR2 i (B) hNOD2. Komórki stymulowano

antygenami w stężeniach: 10 µg/ml dla LTA lub peptydoglikanu i 30 µg/ml dla polisacharydów przez 10 godzin. Jako kontrole pozytywne zastosowano ligand TLR2 Pam3CSK4 (1 µg/ml) i ligand NOD2 dipeptyd muramylowy (MDP; 100 ng/ml), PBS został wykorzystany jako kontrola negatywną. Eksperyment został wykonany dwukrotnie, a zamieszczone dane zostały przedstawione jako średnia ± SEM. Istotną różnicę między kontrolą, a próbkami obliczono za pomocą One-way ANOVA	96
Rycina 28 Graficzne przedstawienie działania <i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> CCD 7952 w mysim modelu uwrażliwienia na OVA (Biorender.com)	109

13 SPIS TABEL

Tabela 1 Typy łańcuchów peptydowych łączących jednostki polisacharydowe w peptydoglikanie zidentyfikowane w szczepach <i>Bifidobacterium</i> (Mattarelli and Biavati, 2018)	39
Tabela 2 Wybrane struktury kwasów lipotejchojowych zidentyfikowane na powierzchni ściany komórkowej <i>Bifidobacterium</i>	43
Tabela 3 Przykładowe struktury polisacharydów zidentyfikowanych na powierzchni ściany komórkowej szczepów <i>Bifidobacterium</i>	46
Tabela 5 Szczepy <i>Bifidobacterium</i> uzyskane z Czeskiej Kolekcji Mikroorganizmów Mleczarskich. Bakterie hodowano w warunkach beztlenowych (80% N ₂ , 10% CO ₂ , 10% H ₂) w pożywce MRSC w temperaturze 37 °C przez 4 -72 godziny.	53
Tabela 6 Linie komórkowe wykorzystane do oceny właściwości immunomodulujących żywych i termicznie inaktywowanych szczepów <i>Bifidobacterium</i>	55
Tabela 7 Określenie przeżywalności bifidobakterii w PBS po 48 i 72 godzinnej inkubacji	72

14 DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

1. Pacyga-Prus, K.; Jakubczyk, D.; Sandström, C.; Šrůtková, D.; **Pyclik, M.J.**; Leszczyńska, K.; Ciekot, J.; Razim, A.; Schwarzer, M.; Górka, S. Polysaccharide BAP1 of *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 is a biologically active molecule with immunomodulatory properties. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *315*, 120980. IF: 10.723
2. **Pyclik M**, Durślewicz D., Papińska J., Deshmukh S. U., Bagavant H. STING agonist-induced skin inflammation is exacerbated with prior systemic innate immune activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4128. IF: 6.208.
3. **Pyclik, M.J.**; Srutkova, D.; Razim, A.; Hermanova, P.; Svabova, T.; Pacyga, K.; Schwarzer, M.; Górka, S. Viability Status-Dependent Effect of *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 on Prevention of Allergic Inflammation in Mouse Model. *Front. Immunol.* **2021**, *12*. IF: 7,561
4. Razim A, **Pyclik M**, Pacyga K, Górka S, Xu J, Olszewski MA, Gamian A, Myc A. Silicone Oil - Based Nanoadjuvants as Candidates for a New Formulation of Intranasal Vaccines. *Vaccines*, **2021**,1–20. IF:4,422
5. **M. Pyclik**, D. Srutkova, M. Schwarzer, S. Górka, Bifidobacteria cell wall-derived exopolysaccharides, lipoteichoic acids, peptidoglycans, polar lipids and proteins – Their chemical structure and biological attributes., *Int. J. Biol. Macromol.*,**2019**,. IF: 4,784
6. D. Wiczew, A. Borowska, K. Szkaradek, T. Biegus, K. Wozniak, **M. Pyclik**, M. Sitarska, L. Jaszewski, L. Radosinski, B. Hanus-Lorenz, S. Kraszewski, Molecular mechanism of vSGLT inhibition by gneyulin reveals antiseptic properties against multidrug-resistant gram-negative bacteria, *J. Mol. Model.* **25**, **2019**. IF: 1,33
7. Dobrut, E. Brzozowska, S. Górka, **M. Pyclik**, A. Gamian, M. Bulanda, E. Majewska, M. Brzychczy-Włoch, Epitopes of immunoreactive proteins of *Streptococcus agalactiae*: enolase, inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and molecular chaperone GroEL *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2018**. IF: 3,520
8. **M. Pyclik**, S. Górka, E. Brzozowska, A. Dobrut, J. Ciekot, A. Gamian, M. Brzychczy-Włoch, Epitope Mapping of *Streptococcus agalactiae* Elongation Factor Tu Protein Recognized by Human Sera *Front. Microbiol*, **2018**. IF: 4,019

Patenty:

1. M. Soroka, **M. Pyclik**, R. Wal, K. Gębala, M. Łukaszewicz; P406276; 2013-11-27; Chiralne poliamfolyty pochodne kwasu dimetylofosfinowego, polialkilenopoliamin i asparaginy oraz sposób ich wytwarzania

2. M. Soroka, **M. Pyclik**, R. Wal, K. Gębala; P406275; 2013-11-27; Chiralne poliamfolyty pochodne kwasu dimetylofosfinowego, polialkilenopoliamin i leucyny, izoleucyny lub norleucyny oraz sposób jej wytwarzania
3. M. Soroka, **M. Pyclik**, R. Wal, K. Gębala; P406273; 2013-11-27; Chiralne poliamfolyty pochodne kwasu dimetylofosfinowego, polialkilenopoliamin i glutaminy oraz sposób ich wytwarzania

Konferencje naukowe:

- 22 - 23.06.23 ChemBiotIC, **prezentacja ustna**: Systemic Inflammation and STING Activation: Implications for Viral Infection Therapeutics, online
- 25.05.2022 Sympozjum BioLab, **prezentacja ustna**: STING activation under pre-existing inflammatory conditions causes severe skin disease, Oklahoma City, USA
- 05 - 09.05.2022 IMMUNOLOGY 2022™, Annual Meeting of The American Association of Immunologists, **prezentacja ustna**: STING activation under pre-existing inflammatory conditions causes severe skin disease, Portland, USA
- 20.05.2021 CarboMet, **prezentacja ustna**: Peptidoglycan – “simple” structure with immunomodulatory potential, online
- 22 - 24.01.2021 Winter School on Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology Digital 2021, **poster**: Modulatory effect of untreated and inactivated *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 on cells of the respiratory system, online
- 19 - 22.05.2020 Virtual Microbiome Summit, **prezentacja ustna**: Heat-killed and untreated *Bifidobacterium* strains affect cytokine production of macrophage cell lines, online
- 02-05.07.2019 Kuźnia Młodych Talentów, **prezentacja ustna**: Czy *Bifidobacterium* może nam pomóc w leczeniu alergii?, Jabłonna k. Warszawy
- 04.10.2018 October SciFest, **prezentacja ustna**: Immunomodulatory effect of *Bifidobacterium* strains on mouse cell lines, Novy Hradek, Czech Republic
- 09 - 12.09.2018 8th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, **prezentacja ustna i poster**: Differentiated impact of *Bifidobacterium* strains and their components on selected cell lines , Dublin, Irlandia
- 17.05.2018 Sympozjum „Prezentacje młodych naukowców 2018”, **prezentacja ustna**: Identyfikacja epitopu czynnika elongacji Tu izolowanego ze *Streptococcus agalactiae* z wykorzystaniem ludzkich przeciwciał krwi pępowinowej, Uniwersytet Wrocławski

- 26 - 27.04.2018 Konferencja Combinat, **prezentacja ustna**: Wykorzystanie modelu matematycznego do analizy przeżywalności *Bifidobacterium* w układzie pokarmowym człowieka, Politechnika Wroclawska
- 04 - 05.03.2017 Konferencja Combinat, **prezentacja ustna**: Wykorzystanie modelu molekularnego do monitorowania przebiegu reakcji syntezy peptydów na podłożu stałym, Politechnika Wroclawska

Udział w realizacji projektów badawczych:

PRELUDIUM UMO- 2019/33/N/NZ7/02294 (NCN): Donosowe podanie probiotyków opracowanie modelu *in vitro* alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa oraz ocena potencjału zastosowania szczepów probiotycznych w jego zapobieganiu i leczeniu

Kierownik: mgr. inż. Marcelina Pyclik
Okres trwania: 09.2020-08.2024

NIH/NIDCR 5R01DE025030: Innate immunity and autoantibodies in the pathogenesis of Sjogren's syndrome

Kierownik: dr Umesh Deshmukh
Okres trwania: 07.2021- 12.2022 (08.2024)

NIH/NIDCR 1R21DE031166: Salivary gland response to innate immune mediators dictates Sjogren's syndrome development

Kierownik: dr Umesh Deshmukh
Okres trwania: 07.2021- 12.2022 (07.2023)

MOBILITY PPN/BIL/2018/1/00005 (NAWA): New strategy for alleviating allergic response: Effect of the surface bacterial antigens in the prevention and treatment of allergic inflammation in mouse model

Kierownik: dr hab. Sabina Górska, prof. IITD PAN
Okres trwania: 01.2019 - 12.2021

SONATA BIS UMO-2017/26/E/NZ7/01202 (NCN): Określenie struktury składników ściany komórkowej wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i ich rola w rozwoju chorób o podłożu alergicznym

Kierownik: dr hab. Sabina Górska, prof. IITD PAN
Okres trwania: 12.2018- 11.2023

OPUS UMO-2013/09/B/NZ6/00801 (NCN): Charakterystyka immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* wraz z identyfikacją epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.

Kierownik: dr hab. Sabina Górska, prof. IITD PAN
Okres trwania: 10.2015 - 03.2017

Stáže naukowe:

07.2021 -12.2022	Program BioLab: Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City USA
08.2020 - 10.2020	ERASMUS+ w Laboratorium Gnotobiologii w Instytucie Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk w Novym Hradku, Czechy
11.2019 - 12.2019	ERASMUS+: Laboratorium Gnotobiologii, Instytut Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk, Novy Hradek
03.2019 - 06.2019	ERASMUS+: Laboratorium Gnotobiologii, Instytut Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk, Novy Hradek
06.2018 - 08.2018	KNOW- IITD (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący): Laboratorium Gnotobiologii, Instytut Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk, Novy Hradek

Nagrody i wyróżnienia:

06.05.2022	Stypendium 2022 AAI Trainee Abstract Award (Portland 2022)
2021 - 2022	Stypendium programu Bio-Lab pod patronatem Fundacji Fulbright Poland
11.2021	Wyróżnienie w studenckim programie stypendialnym Prezydenta Miasta Wrocławia dla doktorantów
10.2020 - 07.2021	Stypendium Dyrektora dla najlepszych doktorantów
10.2018 - 07.2019	Stypendium Dyrektora dla najlepszych doktorantów