Mgr Michał Piotrowski

„Wpływ prebiotyków na adhezję bakterii beztlenowych do ludzkich komórek jelita grubego i badanie biofilmu *Clostridium difficile*"

Streszczenie w języku polskim

Wprowadzenie

Przewód pokarmowy człowieka jest skolonizowany przez bakterie, wirusy, grzyby i archeony określane zespołowo jako microbiota. Około 99% bakterii jelitowych należy do pięciu głównych typów: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Fusobacteria*. W jelicie grubym przeważają bakterie beztlenowe należące do typu *Firmicutes* (65%) i *Bacteroidetes* (25%). Microbiota jelitowa odgrywa ważną rolę w utrzymaniu zdrowia człowieka. Między innymi bierze udział w rozkładaniu nietrawionych przez człowieka substancji o działaniu prebiotycznym, dostających się wraz z pokarmem jak inulina czy fruktooligosacharydy. Oligosacharydy pochodzące z mleka ludzkiego (HMOs, ang. *human milk oligosaccharides*) aktywnie stymulują wzrost poszczególnych członków społeczności bakteryjnej przewodu pokarmowego niemowląt, przynosząc korzyści, stąd należy je traktować jako prebiotyki. W procesie fermentacji prebiotyków powstaje kwas mlekowy, który lekko zakwasza środowisko jelita grubego, hamując w ten sposób rozwój bakterii chorobotwórczych. Skład microbiota jelit ulega w całym życiu człowieka dynamicznym zmianom i jest uzależniony od wielu czynników wewnętrznych i zewnętrznych. W wyniku stosowania antybiotykoterapii może dojść do dysbiozy, czyli zaburzenia równowagi w obrębie microbiota, które może przyczynić się do rozwoju zakażenia *Clostridium difficile* (obecnie *Clostridioides difficile*) (CDI, ang. *C. difficile infection*). U pacjentów z CDI obserwuje się wyraźnie obniżoną liczebność bakterii z rodzaju *Bacteroides,* które stanowią tzw. czynnik oporności na kolonizację (colonization resistance factor).

Pierwszym etapem kolonizacji przewodu pokarmowego przez bakterie zarówno komensalne jak i chorobotwórcze jest ich adhezja do błon śluzowych gospodarza. Warunkuje to długotrwałe przebywanie drobnoustrojów w organizmie człowieka i oddziaływanie na jego zdrowie. Badania nad zdolnością i mechanizmami adhezji bakteryjnej stanowią ważny obszar w dziedzinie mikrobiologii. Substancje takie jak prebiotyki hamują adhezję komórek

bakteryjnych do błon gospodarza. W celach terapeutycznych można zatem próbować zastosować prebiotyki będące składnikiem pożywienia, w tym mleka ludzkiego.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzą trzy oryginalne artykuły tworzące monotematyczny cykl publikacji.

Cel pracy

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu prebiotyków, w tym pochodzących z mleka ludzkiego (HMOs) oraz kandydatów na prebiotyki na adhezję patogenu ludzkiego *C. difficile*, bakterii z rodzaju *Bacteroides* stanowiących naturalną mikroflorę człowieka, a także patogenu biegunkotwórczego *B. fragilis* wytwarzającego enterotoksynę tzw. szczepy ETBF (enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*) do ludzkich komórek nabłonka jelita grubego oraz na wytwarzanie biofilmu. Dodatkowymi celami było wybranie szczepu *Bacteroides* sp. o najlepszych właściwościach adhezyjnych i zbadanie wpływu tego szczepu w kombinacji z prebiotykiem na adhezję oraz tworzenie biofilmu przez *C. difficile*. Ponadto zbadano wpływ HMOs na ekspresję genów *cwp66* i *cwp84 C. difficile* kodujących białka odpowiedzialne za adhezję tego patogenu.

Materiał i metody

Badania zdolności adhezji bakterii beztlenowych jak i zahamowania adhezji bakterii przez prebiotyki przeprowadzono na liniach komórkowych wywodzących się z komórek nabłonkowych jelita grubego, w tym nowotworowych HT-29 (linia nieśluzowa) i HT-29 MTX (linia śluzowa) oraz linii wywodzącej się z komórek zdrowego jelita grubego CCD 841 CoN. Biofilm badano za pomocą dwóch metod (1) na płytkach titracyjnych, a utworzony biofilm barwiono fioletem krystalicznym oraz (2) na specjalnych szalkach ze szklanym dnem, a powstały biofilm wizualizowano przy użyciu skanującej laserowej mikroskopii konfokalnej. Badanie wpływu HMOs na ekspresję genów *cwp66* i *cwp84* przeprowadzono wykorzystując metodę real-time PCR.

Wyniki

W pierwszej pracy przedstawiono wyniki badania wpływu prebiotyków i kandydatów na prebiotyki takich jak celobioza (CEL), fruktooligosacharydy (FOS), inulina (INU), mannoza (MAN) i rafinoza (RAF) na adhezję i tworzenie biofilmu przez szczepy *C. difficile*, w tym dwa szczepy - referencyjny 630 i kontrolny M120 oraz 10 szczepów klinicznych należących do tzw. PCR-rybotypu 027 (RT027), które wybrano do badań ze względu na ich potencjał chorobotwórczy (szczepy hiperepidemiczne). Wśród badanych substancji o właściwościach

prebiotyku największy potencjał antyadhezyjny wykazano w przypadku FOS i MAN. Zaobserwowano, również w obecności niskich stężeń tj. 1% FOS i 1% MAN wzmożony wzrost biofilmu szczepów *C. difficile.* Jednak w przypadku klinicznych szczepów RT027 nie stwierdzono istotności statystycznej w przypadku użycia metody na płytkach titracyjnych. Wyraźne różnice w wyglądzie biofilmu w obecności tych samych prebiotyków tj. FOS i MAN w stężeniu 1% zaobserwowano używając skanującej laserowej mikroskopii konfokalnej. Struktura biofilmu była bardziej „chropowata", heterogenna z obecnością wielu agregatów, w porównaniu do gładkiej powierzchni i bardziej jednorodnej bez prebiotyku. Wykazano, że prebiotyki wpływają na adhezję i tworzenie biofilmu *C. difficile* w zróżnicowany sposób, w zależności od ich stężenia.

W drugiej publikacji przedstawiono wyniki badań wpływu siedmiu prebiotyków i kandydatów na prebiotyk tj. FOS, galaktooligosacharydy (GOS), INU, laktuloza (LAC), MAN, RAF i CEL na adhezję i wytwarzanie biofilmu przez szczepy bakterii beztlenowych należących do gatunków wchodzących w skład microbiota przewodu pokarmowego człowieka tj. *B. fragilis* (szczepy nieenterotoksynotwórcze) i *B. thetaiotaomicron* jak też patogenu *B. fragilis* (szczep enterotoksynotwórczy). Były to szczepy wzorcowe jak i kliniczne. Ponadto zbadano wpływ samych bakterii z rodzaju *Bacteroides* jak też w kombinacji z prebiotykiem FOS (potencjalny synbiotyk) na adhezję oraz na tworzenie biofilmu *C. difficile* 630. Wykazano zróżnicowany wpływ wybranych prebiotyków oraz kandydatów na prebiotyk na adhezję oraz tworzenie biofilmu przez szczepy z rodzaju *Bacteroides*. Największe działanie antyadhezyjne stwierdzono w przypadku INU, MAN i RAF. W pracy wykazano, że inkubacja *C. difficile* z nieenterotoksynotwórczym szczepem *B. fragilis* jak i *B. thetaiotaomicron* spowodowała znaczące zahamowanie zarówno adhezji jak też tworzenia biofilmu. Kombinacja połączenia szczepu z rodzaju *Bacteroides* sp. (potencjalny probiotyk) i FOS (prebiotyk) wpływała na hamowanie adhezji oraz tworzenie biofilmu przez patogen ludzki *C. difficile*.

W ostatniej pracy wchodzącej w zakres rozprawy doktorskiej zbadano wpływ prebiotyków pochodzących z mleka ludzkiego (HMOs) tj. 3'-sialyllaktozy (3'-SL) i 6'-sialyllaktozy (6'-SL) na adhezję i tworzenie biofilmu *C. difficile* oraz ekspresję genów *cwp84 i cwp66* kluczowych w adhezji tego drobnoustroju. Obecność oligosacharydów 3'-SL i 6'-SL w stężeniu 1% istotnie obniżyła adhezję *C. difficile* do komórek trzech badanych linii. Przy użyciu skanującej laserowej mikroskopii konfokalnej uwidoczniono zmiany w biofilmie zachodzące pod wpływem HMOs, jeśli porównano ten obraz z obrazem biofilmu kontrolnego bez obecności HMOs. W obecności 3'-SL gęstość struktury biofilmu *C. difficile* była mniejsza w porównaniu

do kontroli, podczas gdy w obecności 6'-SL wzrastała gęstość biofilmu. Zaobserwowano zmiany w wyglądzie komórek *C. difficile* tj. ich wydłużenie. Obydwa prebiotyki HMOs hamowały ekspresję genu *cwp84* natomiast nie obserwowano istotnej zmiany w ekspresji genu *cwp66*.

Wnioski

Prebiotyki i kandydaci na prebiotyk mają zróżnicowany wpływ na adhezję ludzkiego patogenu *C. difficile* a także bakterii z rodzaju *Bacteroides* będących składnikiem microbiota przewodu pokarmowego człowieka do ludzkich komórek nabłonka jelita grubego oraz formowanie biofilmu. W szczególności wysoki potencjał antyadhezyjny wykazywały FOS, MAN i HMOs (3'-SL i 6'-SL) w hamowaniu adhezji *C. difficile*. Wyniki zaprezentowanych badań wskazują na potencjalną rolę prebiotyków i synbiotyków w walce z *C. difficile.*