

Streszczenie w języku polskim

ROLA ARCHEONÓW METANOGENNYCH W NIESWOISTYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH JELIT U DZIECI

Wstęp: Archeony metanogenne są istotnym składnikiem mikrobioty jelitowej, a zasiedlanie przez nie jelit człowieka rozpoczyna się we wczesnej ontogenezie. Zmiany w zakresie składu archeonów metanogennych i/lub ich liczebności mogą mieć związek z rozwojem różnych jednostek chorobowych, w tym nieswoistych chorób zapalnych jelit (IBD). Dysbioza bakteryjna jest znanym zjawiskiem powiązanim z rozwojem IBD u dzieci i dorosłych, niewiele jednak wiadomo o roli dysbiozy archeonów, szczególnie u dzieci. Znaczenie archeonów metanogennych w IBD zostało przedstawione w pracy poglądowej pt. *The Role of Methanogenic Archaea in Inflammatory Bowel Disease—A Review* (Cisek i wsp., *Journal of Personalized Medicine*, 2024)

Cele: Głównym celem rozprawy doktorskiej była ocena znaczenia archeonów metanogennych w IBD u dzieci. Cel ten został osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych, które zostały opisane w poszczególnych artykułach oryginalnych. Cele szczegółowe obejmowały: 1) opracowanie autorskiego protokołu detekcji archeonów metanogennych w próbkach kału, walidację protokołu z użyciem próbek kałomoczu kur; 2) ocenę w badaniach przedklinicznych wpływu czynników środowiskowych na populację metanogenów w jelitach kur; 3) analizę liczebności archeonów metanogennych w kale dzieci z IBD w porównaniu z dziećmi z grupy kontrolnej oraz ocena zależności pomiędzy liczebnością tych drobnoustrojów a typem i stopniem aktywności choroby oraz wiekiem dzieci.

Grupy badawcze, materiał i metody: W badaniach wzięło udział 124 pacjentów w wieku od 3 do 18 lat, w tym 45 dzieci z rozpoznaniem choroby Leśniowskiego-Crohna (CD; ang. *Crohn's disease*), 52 dzieci z rozpoznaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (UC; ang. *ulcerative colitis*) oraz 27 dzieci z grupy kontrolnej. Grupę tę stanowiły dzieci bez rozpoznania IBD. Aktywność procesu chorobowego została oceniona przy pomocy następujących indeksów: indeks PUCAI (ang. *Pediatric ulcerative colitis activity index*) oraz indeks PCDAI (ang. *Pediatric Crohn's disease activity index*) a także oceny stężenia kalprotektyny w kale (FCP; ang. *fecal calprotectin*). Stężenie FCP oznaczano w technologii chemiluminescencji. Do badań przedklinicznych włączono 174 kury hodowane w trzech systemach hodowlanych (wiejskim, fermowym i eksperymentalnym), zróżnicowane pod względem dostępu do środowiska naturalnego, podaży antybiotyków i diety. Badano także wpływ wieku i rodzaju pobranej próbki (kałomocz vs treść jelitowa) na zawartość metanogenów. Z kału pacjentów, a także kałomoczu i treści jelit ślepych pobranych od kur wyizolowano DNA. Dodatkowo, jako kontrole użyto próbek DNA pochodzących od 3 gatunków archeonów metanogennych i jednego konstruktów plazmidowego oraz próbek DNA wyizolowanych z 21 szczepów bakteryjnych. Oznaczenia ilościowe populacji

metanogenów w jelitach ludzi i zwierząt wykonano techniką real-time PCR, celując m.in. w swoisty dla archeonów metanogennych gen *mcrA* kodujący białko enzymu zaangażowanego w ostatni etap metanogenezy u tych mikroorganizmów.

Wyniki: Wyniki badań przedstawiono w 3 pracach oryginalnych. W pracy pt. *Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples* (Cisek i wsp., *Microorganisms*, 2023) opisano protokół detekcji archeonów metanogennych z wykorzystaniem genu *mcrA*. Protokół ten cechował się lepszymi parametrami walidacyjnymi od dotychczas powszechnie stosowanej metody. Charakteryzował się on bowiem zwiększoną swoistością i czułością, odtwarzalnością oraz szerszym zakresem detekcji liniowej (pozwalał on oznaczyć 7 zamiast maksymalnie 6 rzędów wielkości kopii genu *mcrA*). Autorski protokół pozwolił zatem na obniżenie koniecznej do uzyskania pozytywnego wyniku liczby komórek (genomów) metanogenów w badanym materiale nawet o jeden rząd wielkości (np. z 571 do 57 kopii genu *mcrA* gatunku *Methanomicrobium mobile* w mieszaninie reakcyjnej). Najniższa, oznaczalna ilościowo przy częstotliwości 100% liczba kopii genu *mcrA* wynosiła 21 kopii na reakcję. Autorski protokół obniżył ponadto ryzyko fałszywie dodatniego wyniku w próbkach niezawierających metanogenów. Protokół ten pozwolił bowiem zminimalizować negatywny wpływ dimeryzacji starterów oraz innych reakcji krzyżowych (których źródłem może być DNA bakteryjne izolowane z kału) na odczyt wyników real-time PCR. Ponadto, przy zastosowaniu nowego protokołu obecność metanogenów stwierdzona została we wszystkich 20 badanych próbkach kałomoczu, natomiast aż 7 wypadło ujemnie z użyciem protokołu innych autorów.

Przeprowadzone badania przedkliniczne opisane w artykule pt. *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens* (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2023) potwierdziły skuteczność opracowanej metodyki. Badania eksperymentalne pokazały, że w grupie kur eksperymentalnych, hodowanych w ściśle kontrolowanych, izolowanych od środowiska naturalnego warunkach, nie wykryto obecności archeonów metanogennych, natomiast jelita ślepe kur wiejskich i fermowych były zasiedlone na porównywalnym poziomie, tj. 10^4 do 10^5 komórek/gram badanej próbki. Ponadto wykazano, że liczebność metanogenów jest różna w zależności od rodzaju próbki (kałomocz zawierał istotnie więcej metanogenów niż treść jelitowa; $p < 0.001$), oraz od wieku zwierzęcia (w grupie 1-tygodniowych kur fermowych obserwowano istotnie mniej metanogenów niż u kur fermowych w wieku 3-4 oraz 5-6 tygodni; $p < 0,01$). Wykazano zatem, że czynniki środowiskowe, wiek kury oraz rodzaj pobranej do badań próbki okazały się istotnymi czynnikami warunkującymi obecność archeonów metanogennych w badanym materiale.

W pracy pt. *Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity* (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2024) pokazano, że u dzieci chorujących na IBD zaobserwowano istotny statystycznie spadek w liczbie populacji całkowitej metanogenów, zarówno w kale dzieci chorujących na UC ($p < 0,001$) jak i CD ($p < 0,05$), w

stosunku do dzieci z grupy kontrolnej. Ponadto, liczebność metanogenów była niższa w UC niż w CD ($p < 0,05$). Częstość występowania tych mikroorganizmów także była znacząco niższa, szczególnie w grupie pacjentów z UC ($p < 0,05$) i wynosiła 83% w porównaniu do grupy kontrolnej, w której częstość występowania ogólnej populacji metanogenów wynosiła 100%. W tej samej grupie chorych stwierdzono także dodatnią korelację pomiędzy liczebnością *Methanosphaera stadtmanae* a stężeniem kalprotektyny w kale ($R_s = 0,41$; $p < 0,05$). Z kolei w grupie pacjentów z aktywną postacią CD zaobserwowano statystycznie istotny spadek liczebności zarówno całkowitej populacji metanogenów ($R_s = -0,56$; $p < 0,01$) oraz *Methanobrevibacter smithii* ($R_s = -0,53$; $p < 0,05$) wraz z wiekiem.

Podsumowanie wyników i wnioski: W pracy wykazano, że 1. liczebność i częstość występowania archeonów metanogennych w kale podlega zmianom w zależności od czynników środowiskowych i wieku gospodarza; 2. U dzieci z IBD występuje dysbioza w populacji archeonów metanogennych, która zależy od postaci IBD (CD vs UC) oraz aktywności procesu chorobowego; 3. Uzyskane wyniki oraz analiza literatury pokazują, że dysbioza w populacji archeonów metanogennych może być następstwem procesu zapalnego towarzyszącemu IBD, a nie czynnikiem wywołującym chorobę.