

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

ANNA DUDA-MADEJ | MICHAŁ TURNIAK | URSZULA KASPRZYKOWSKA | BARBARA PAWŁOWSKA | BEATA SOBIESZCZAŃSKA

WPŁYW TNF- α NA POZIOM ADHEZJI I INWAZJI SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* W PRZEBIEGU CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA

THE EFFECT OF TNF- α ON THE LEVEL OF ADHESION AND INVASION OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS IN THE COURSE OF CROHN'S DISEASE

STRESZCZENIE: Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały rolę patogennych adherentno-inwazyjnych szczepów *Escherichia coli* (AIEC) w indukcji sekrecji TNF- α oraz ich zdolność adhezji do cząstek powierzchniowych CEACAM6 na komórkach nabłonka jelita człowieka. Wzrost sekrecji TNF- α indukuje z kolei zwiększoną ekspresję cząstek adhezyjnych CEACAM6, co nasila adhezję pałeczek AIEC. Bardzo ważne jest wyjaśnienie roli w procesie adhezji do nabłonka jelita człowieka fimbrii typu 1, dzięki którym szczepy AIEC wchodzą w interakcję z cząstkami CEACAM6.

SŁOWA KLUCZOWE: adhezja, AIEC, inwazja, receptory powierzchniowe CEACAM6, TNF- α

ABSTRACT: Recent studies have demonstrated the role of pathogenic *Escherichia coli* – adherent-invasive strains (AIEC) in the induction of TNF- α secretion and their ability to adhere to CEACAM6 molecules on the surface of human intestinal epithelial cells. The increase of TNF- α production induces the expression of CEACAM6, which increases the adhesion of the AIEC bacteria. It is very important to clarify the role of type 1 fimbriae in the process of adhesion to the epithelium of the human intestinal cells, which is linked to the interaction between the AIEC and CEACAM6 molecules.

KEY WORDS: adhesion, AIEC, CEACAM6, invasion, TNF- α

Katedra i Zakład Mikrobiologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

✉ ANNA DUDA-MADEJ

Katedra i Zakład Mikrobiologii,
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu,
ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław,
e-mail: anna.duda-madej@umed.wroc.pl

Wpłynęło: 30.05.2018

Zaakceptowano: 15.06.2018

DOI: dx.doi.org/10.15374/FZ2018021

WSTĘP

W badaniach nieznanego patomechanizmu choroby Leśniowskiego-Crohna (chLC) wykazano, że przyczyną stanu zapalnego i uszkodzenia tkanek są zaburzenia odpowiedzi immunologicznej na obecność bakterii jelitowych. U pacjentów z chLC stwierdzono nadekspresję glikoproteinowych receptorów powierzchniowych komórek nabłonka (ang. carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 – CEACAM6), uczestniczących w wiązaniu adherentno-inwazyjnych szczepów *Escherichia coli* (AIEC). Proces kolonizacji odbywa się z udziałem fimbrii typu 1, które są zarazem czynnikami wirulencji tych szczepów [1]. Obecność cząstek adhezyjnych CEACAM6 na powierzchni komórek nabłonka jelita ułatwia kolonizację szczepów AIEC, a następnie ich inwazję do komórek nabłonka. Dotychczas wykazano, że adherentno-inwazyjne szczepy *E. coli* mają niezwykłą zdolność namnażania się w makrofagach blaszki podstawnej błony śluzowej jelita, które w odpowiedzi uwalniają duże ilości czynnika martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor α – TNF- α) [2]. W efekcie

dochodzi do nadekspresji CEACAM6 na powierzchni nabłonka, co umożliwia dalszą adhezję szczepów AIEC, to z kolei skutkuje lokalnym owrzodzeniem enterocytów i powstawaniem mikroowrzodzeń błony śluzowej jelita, przekształcających się stopniowo w ziarniniaki. Wielu naukowców jest zdania, że wzrost poziomu TNF- α jest związany z przewlekłymi zakażeniami przewodu pokarmowego. Niektórzy uważają, że podwyższony poziom czynnika martwicy nowotworu ma związek z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, natomiast nie koreluje z uszkodzeniami błony śluzowej jelita w przebiegu chLC [3].

W dotychczasowych badaniach wykazano, że patogenne szczepy *E. coli*, należące do patotypu adherentno-inwazyjnego, cechuje zdolność wzmożonej adhezji i inwazji do komórek nabłonka jelita stymulowanych TNF- α . W niniejszej pracy oceniono wpływ nadekspresji cząstek adhezyjnych CEACAM6 na komórkach nabłonka jelita stymulowanych przez czynnik martwicy nowotworu na zdolność adhezji i inwazji patogennych szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków nieswoistych zapaleń jelit (ang. inflammatory bowel disease – IBD) u dzieci.

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

MATERIAŁY I METODY

POCHODZENIE SZCZEPÓW

Do badań użyto wzorcowego szczepu *Escherichia coli* AIEC, LF82, izolowanego od dorosłego pacjenta z chorobą Leśniowskiego-Crohna; wzorcowego niepatogenicznego szczepu *E. coli* K12 oraz dwóch dzikich szczepów *E. coli*: jednego izolowanego od dziecka z chLC (LC15/1) oraz jednego izolowanego od dziecka z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC32/2).

WYKRYWANIE FIMBRII MS/MR TYPU 1

Zdolność produkcji fimbrii mannozo-wrażliwych i mannozo-opornych typu 1 oznaczano u badanych szczepów poddanych trzem 48-godzinnym pasażom w podłożu tryptozowo-sojowym. Uzyskany w ten sposób osad bakteryjny rozpuszczano w soli fizjologicznej i mieszano odpowiednio z 10% roztworem drożdży piekarniczych oraz 1% D-mannozą. Zawiesinę mieszano przez 2–3 minuty ruchem kulistym. Wynik aglutynacji odczytywano po 5–15 minutach.

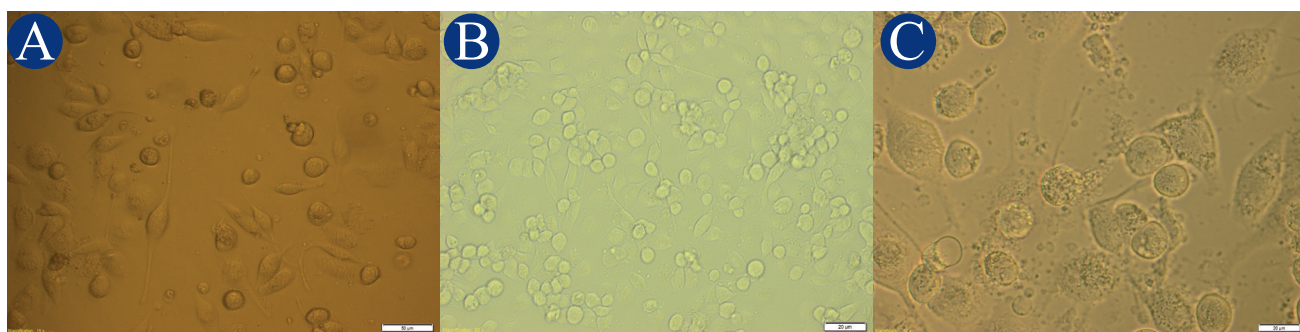
TEST ADHEZJI

Zdolność adhezji *in vitro* badanych szczepów *E. coli* określano ilościowo na podstawie testu adhezji do zróżnicowanej 10–13-dniowej linii Caco-2 (ludzkie komórki nabłonka jelita grubego) [4]. Linie komórkowe hodowano w podłożu MEM 20% z płodową surowicą bydlęcą,

z dodatkiem roztworu antybiotyków oraz aminokwasów endogennych, pirogronianiu sodowego, L-glutaminu i HEPES. Po zakażeniu komórek nabłonka badanymi szczepami *E. coli* (MOI=100) poddano je lizie, a uzyskane lizaty – po rozcieńczeniu w postępie geometrycznym – wysiewano na podłoże MacConkey'a. Liczbę bakterii przylegających obliczano na podstawie ilości wyrosłych kolonii i wyjściowej liczby bakterii użytych do zakażenia ustalonej liczby komórek nabłonka jelita. Zdolność adhezji *in vitro* badanych szczepów *Escherichia coli* określano jednocześnie w obecności lub braku 2% D-mannozy. Równocześnie test adhezji wykonano na komórkach uprzednio stymulowanych przez 24 godziny TNF- α w stężeniu 50 ng/ml.

TEST INWAZJI

Zdolność inwazji *in vitro* badanych szczepów *Escherichia coli* określano ilościowo na podstawie testu inwazji do komórek zróżnicowanej 10–13-dniowej linii Caco-2 według zmodyfikowanej metody, opisanej przez Falkow i wsp. [5]. Komórki nabłonka zakażano badanymi szczepami *E. coli* (OD=9 \times 10⁸ cfu/ml) – tak aby na jedną komórkę nabłonka przypadało 100 komórek bakteryjnych (MOI=100). Po 4-godzinnej inkubacji w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂, bakterie związane z powierzchnią komórek nabłonka usunięto poprzez inkubację w podłożu zawierającym gentamycynę (Ck=100 μ g/ml). Bakterie uwolnione z komórek nabłonka poprzez lizę rozcieńczano w postępie geometrycznym i wysiewano na podłoże MacConkey'a. Jednocześnie zdolność badanych szczepów do inwazji sprawdzano na komórkach zastymulowanych TNF- α (24 godziny, Ck=50 ng/ml).



Ryc. 1. A. Makrofagi (kontrola negatywna). B. Szczep degradowany wewnątrz komórki żernej. C. Szczep *E. coli* LF82 wykazujący zdolność przeżycia i namnażania się wewnątrz komórki fagocytarnej.

Tabela 1. Indeks fagocyтары i indeks przeżywalności.

Szczep <i>E. coli</i>	Indeks fagocyтары (%) \pm SD t=0	Indeks przeżywalności (%) \pm SD t=24
LC15/1	0,825 \pm 0,19	0,302 \pm 0,24
UC32/2	0,594 \pm 0,22	0,088 \pm 0,06
LF82	0,500 \pm 0,19	1,013 \pm 0,00
K12	0,199 \pm 0,02	0,005 \pm 0,002

Tabela 2. Poziom adhezji.

Szczep <i>E. coli</i>	Poziom adhezji (cfu/ml \times 10 ⁶) \pm SD			
	Bez D-mannozy		Z D-mannożą	
	Bez TNF- α	Z TNF- α	Bez TNF- α	Z TNF- α
LC15/1	2,93 \pm 1,22	5,24 \pm 0,51	2,90 \pm 1,33	9,18 \pm 0,95
UC32/2	4,94 \pm 1,78	22,30 \pm 4,10	3,08 \pm 2,47	5,22 \pm 1,66
LF82	111,00 \pm 66,80	228,00 \pm 87,00	7,12 \pm 1,31	16,80 \pm 4,46
K12	13,40 \pm 1,63	13,20 \pm 1,37	2,22 \pm 0,17	2,02 \pm 0,58

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

ZDOLNOŚĆ PRZEŻYWANIA WEWNĄTRZ MAKROFAGÓW

Test fagocytozy przeprowadzono na ciągłej linii ludzkich monocytów THP-1 (4×10^5 komórek/ml), w RPMI-1640 wzbogaconym 10% surowicą bydlęcą, L-glutaminą (2 mM) oraz roztworem antybiotyków. Namnożone monocyty różnicowano przez 48 godzin w makrofagi za pomocą 1 mM PMA (ang. phorbol-12-myristate-13-acetate). Makrofagi zakażano badanymi szczepami *E. coli* w stosunku 10:1 (MOI=10) i inkubowano przez 20 minut ($t=0$), a następnie przez 24 godziny (przeżywanie). Kolejno komórki poddano lizie za pomocą 1% roztworu Tritonu X-100. Uzyskane lizaty rozcieńczano w postępie geometrycznym i wysiewano na podłoże MacConkey'a. Na podstawie uzyskanych wyników dla badanych szczepów i określonych czasów obliczano indeks fagocyturny, czyli stosunek bakterii sfagocytowanych przez makrofagi do wyjściowej liczby bakterii, uwzględniając liczbę makrofagów użytych w doświadczeniu.

OZNACZANIE CZĄSTEK ADHEZYJNYCH CEACAM6 METODĄ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

Ekspresję cząstek adhezyjnych CEACAM6 oceniano na powierzchni komórek nabłonka jelita grubego (Caco-2) według zmodyfikowanej metody Ieta i wsp. [6]. Po trzygodzinnej inkubacji badanych szczepów z komórkami nabłonka komórki oderwano z podłoża, przemyto zimnym PBS z dodatkiem 0,5% BSA i poddano reakcji z monoklonalnymi przeciwciałami anti-CEACAM6, znakowanymi allofityczną. Inkubowano przez 30–45 minut, a następnie trzykrotnie przemyto roztworem PBS z 0,5% BSA. Poziom

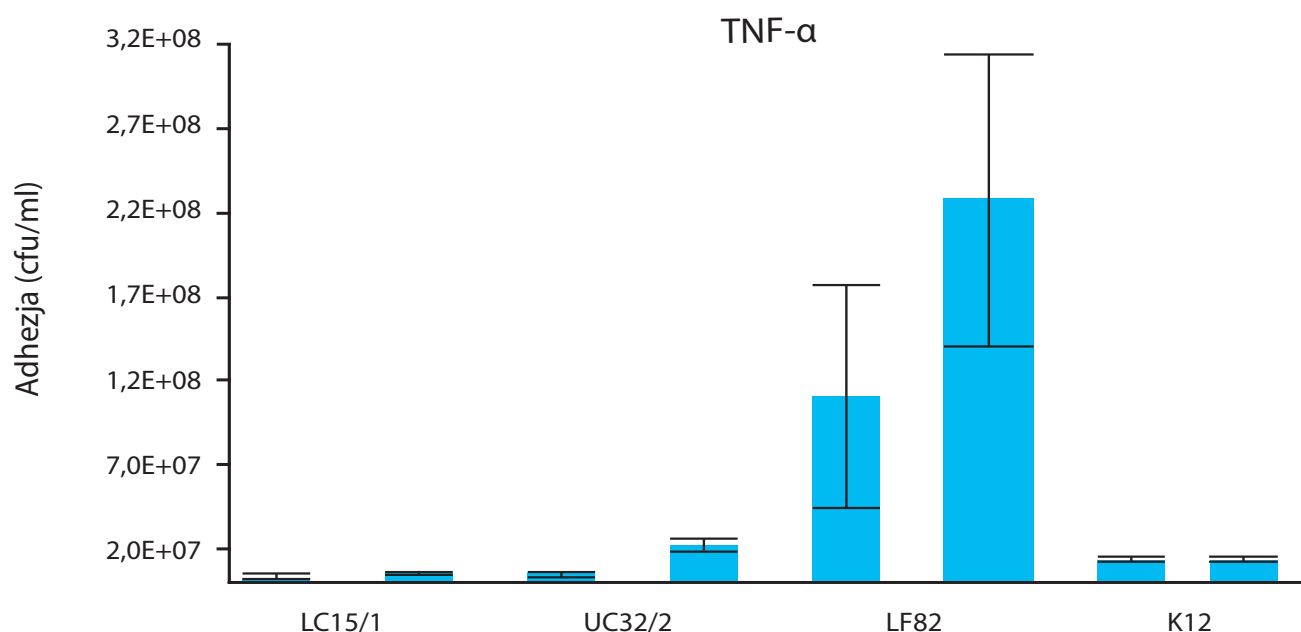
ekspresji cząstek CEACAM6 oceniano na podstawie intensywności sygnału barwnika fluoryzującego skoniugowanego z przeciwciałem anti-CEACAM6, odczytywanego w cytometrze przepływowym [7]. To samo doświadczenie powtórzono po stymulacji komórek nabłonka TNF- α (24 godziny; Ck=50 ng/ml).

WYNIKI

Wśród badanych szczepów *Escherichia coli* trzy wykazały ekspresję fimbrii typu 1 na swojej powierzchni, szczepy LC15/1 oraz LF82 – fimbrii mannozo-opornych (aglutynacja w obecności D-mannozy), natomiast szczep K12 – mannozo-wrażliwych (aglutynacja w nieobecności D-mannozy). Szczep UC32/2 nie wykazał zdolności agregacji komórek drożdży piekarniczych zarówno w obecności, jak i nieobecności D-mannozy.

Przeprowadzony test fagocytozy pokazał, że badane szczepy *E. coli* nie wykazały zdolności przeżywania w makrofagach. Były one degradowane wewnątrz komórek fagocyturnych – w przeciwieństwie do szczepu kontrolnego LF82, dla którego liczba wewnątrzkomórkowych bakterii wzrosła po 24 godzinach inkubacji (Tabela 1), co wskazało na namnażanie się tego szczepu wewnątrz komórki żernej (Ryc. 1).

W teście adhezji zaobserwowano, że badane szczepy *Escherichia coli* wykazały wyższy stopień adhezji do komórek nabłonka jelita grubego uprzednio stymulowanych TNF- α . Stymulacja czynnikiem martwicy nowotworu nie wpływała jednak na poziom adhezji niepatogennego szczepu *E. coli*, K12. Ponadto w obecności D-mannozy zaobserwowano obniżenie się (w niektórych przypadkach znaczne, w innych



Ryc. 2. Poziom adhezji (cfu/ml) badanych szczepów do stymulowanej TNF- α oraz niestymulowanej różnicowanej linii Caco-2 bez obecności D-mannozy.

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

Tabela 3. Porównanie wyników inwazji badanych szczepów do zróżnicowanych linii Caco-2 stymulowanych i niestymulowanych TNF- α .

Szczep <i>E. coli</i>	Poziom inwazji (cfu/ml $\times 10^4$) \pm SD			
	Bez D-mannozy		Z D-mannozą	
	Bez TNF- α	Z TNF- α	Bez TNF- α	Z TNF- α
LC15/1	1,28 \pm 0,33	2,00 \pm 2,06	1,01 \pm 0,33	0,84 \pm 0,26
UC32/2	0,92 \pm 0,40	1,05 \pm 0,5	1,07 \pm 0,53	0,39 \pm 0,19
LF82	10,9 \pm 2,83	45,6 \pm 8,88	7,49 \pm 0,82	36,4 \pm 14,4
K12	0,49 \pm 0,19	1,75 \pm 0,66	0,27 \pm 0,18	1,90 \pm 0,65

mniej znaczące) poziomu adhezji badanych szczepów (Tabela 2, Ryc. 2 i 3). Najbardziej widoczny wpływ D-mannozy na zdolność do adhezji odnotowano w odniesieniu do szczepu *E. coli* LF82, u którego poziom adhezji bez obecności D-mannozy wynosił 111 \pm 66,8 (cfu/ml $\times 10^6$), natomiast tylko 7,12 \pm 1,31 (cfu/ml $\times 10^6$) w obecności D-mannozy. Co ciekawe, szczep UC32/2, który nie posiada fimbrii typu 1, wykazał adhezję na komórkach zastymulowanych na poziomie 22,30 \pm 4,10 (cfu/ml $\times 10^6$). Wynik ten miał związek najprawdopodobniej z jakimś innym czynnikiem wirulencji, który posiada ten szczep, np. z amyloidowymi fimbriami spiralnymi.

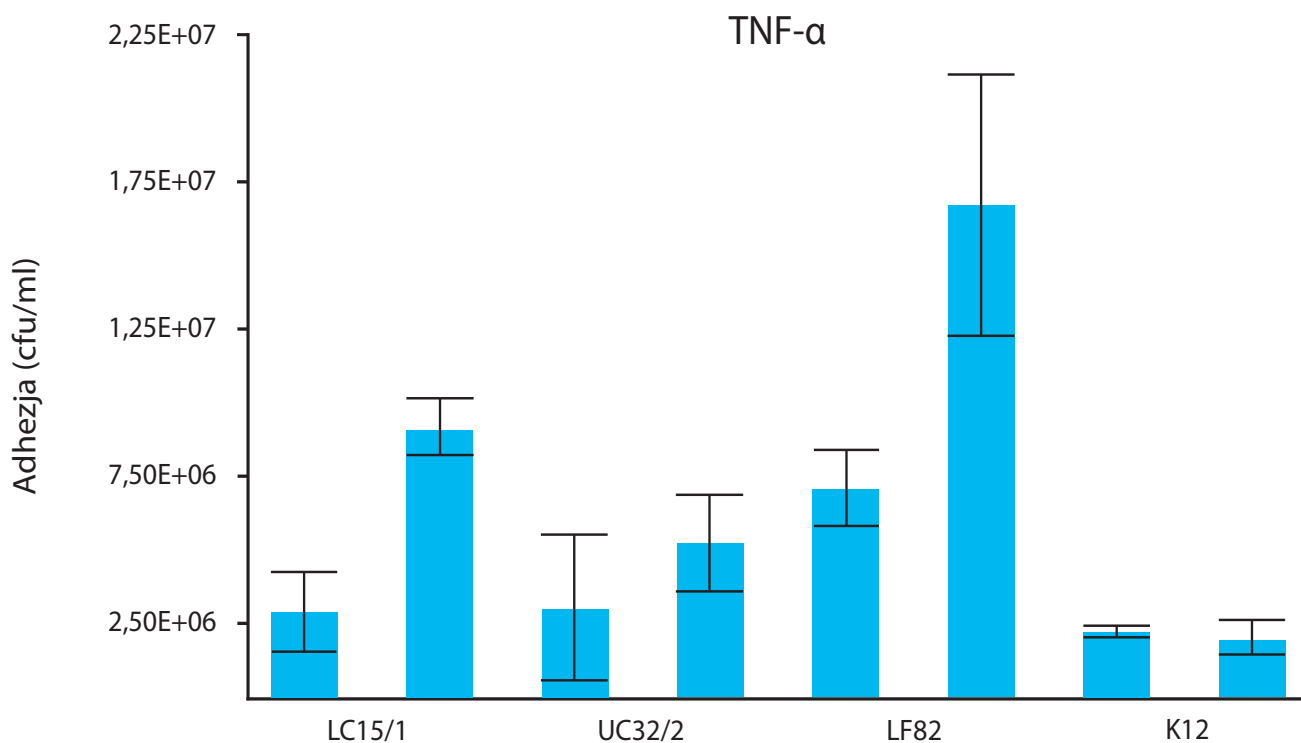
W teście inwazji dwa z czterech badanych szczepów *E. coli* wykazały wyższą zdolność wnikania w głąb stymulowanych komórek nabłonka jelita grubego w porównaniu do komórek niepotraktowanych uprzednio TNF- α (Tabela 3). Szczepy dzikie LC15/1 oraz UC32/2 w obecności D-mannozy były internalizowane przez stymulowane

komórki nabłonka na poziomie niższym w porównaniu do komórek niestymulowanych (Ryc. 4).

W metodzie cytometrii przepływowej nadekspresję cząstek adhezyjnych CEACAM6 zaobserwowano w przypadku szczepów LF82 oraz UC32/2. Jednakże jej poziom nie był wysoki i wynosił odpowiednio 7% oraz 1,2% w porównaniu do kontroli dodatniej. Pozostałe badane szczepy nie wykazały nadekspresji cząstek CEACAM6 na powierzchni komórek nabłonka.

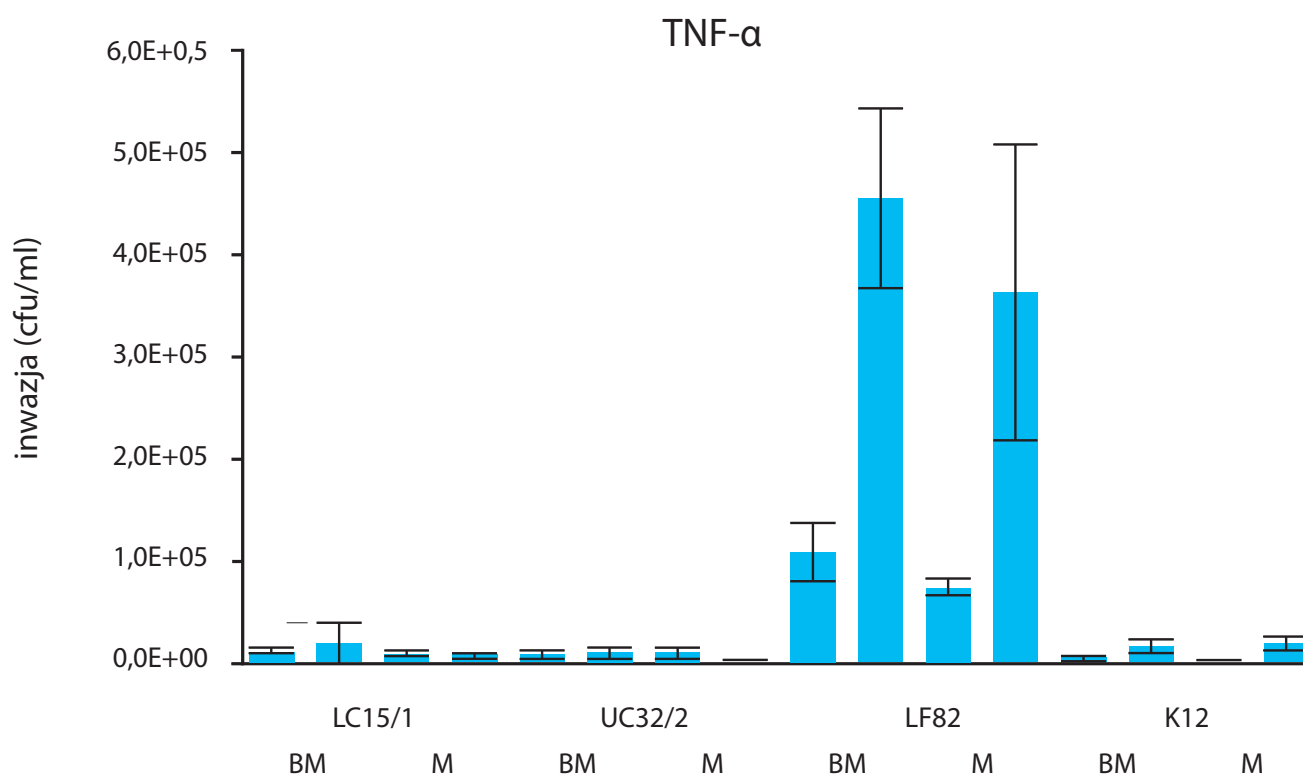
OMÓWIENIE I WNIOSKI

W przeprowadzonych badaniach udowodniono udział fimbrii typu 1 w procesie adhezji do nabłonka jelita człowieka. Wiadomo, że fimbrie te, będące czynnikiem wirulencji szczepów AIEC, rozpoznają receptor GPI zakotwiczony w cząsteczce CEACAM6, której nadekspresję zaobserwowano u pacjentów z chLC. W wyniku zniszczeń, do których dochodzi na drodze relacji CEACAM6–AIEC, są uwalniane duże ilości TNF- α . Badania zdolności adhezji wykazały wyższy poziom adhezji na komórkach stymulowanych u wszystkich badanych szczepów. Potwierdzono to w badaniach wykonanych przez Korczowskiego i wsp., w których zasugerowano, że sekrecja TNF- α w błonie śluzowej jelita jest związana z ostrym przebiegiem IBD oraz obecnością ziarniaków charakterystycznych dla chLC [8]. Poziom adhezji po zablokowaniu fimbrii typu 1 – mimo że drastycznie spadł w porównaniu do sytuacji, w której blokowania nie



Ryc. 3. Poziom adhezji (cfu/ml) badanych szczepów do stymulowanej TNF- α oraz niestymulowanej zróżnicowanej linii Caco-2 w obecności D-mannozy.

- ! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.



Ryc. 4. Poziom inwazji (cfu/ml) badanych szczepów do stymulowanej TNF- α oraz niestymulowanej zróżnicowanej linii Caco-2 w obecności i nieobecności D-mannozy.

M – mannoza, BM – bez mannozy.

stosowano – był wyższy również w przypadku komórek za-stymulowanych czynnikiem martwicy nowotworu. Obniżenie się poziomu adhezji badanych szczepów *E. coli* w obecności D-mannozy potwierdza sugestię, że interakcje pomiędzy fimbriami typu 1 szczepu AIEC a enterocytami u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna następują przez reszty mannozowe znajdujące się w szczytowej części enterocytów.

W badaniach Barnicha i wsp. nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem adhezji szczepu LF82 a poziomem ekspresji cząstek CEACAM6 [1]. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy wskazano, że szczep ten posiada – w porównaniu z pozostałymi badanymi szczepami – zdolność adhezji na wysokim poziomie. Wykazywał on również nieznacznie zwiększoną ekspresję receptorów powierzchniowych CEACAM6 (7%). Ponadto tylko szczep LF82 cechował się zdolnością przeżywania wewnątrz komórek fagocytarnych. Pozostałe szczepy nie posiadały tej zdolności, charakterystycznej dla patotypu AIEC. Poziom inwazji szczepu LF82 był również najwyższy spośród badanych szczepów, zarówno w przypadku komórek niestymulowanych, jak i stymulowanych TNF- α .

Wykonane badania sugerują, że szczepy izolowane z przypadków przewlekłych zapaleń przewodu pokarmowego u dzieci nie należą do patotypu AIEC, bowiem nie wykazują wszystkich cech charakterystycznych dla niego. Wielce prawdopodobnym wydaje się fakt, że kolonizacja patogennymi szczepami *E. coli* zaczyna się już w okresie

dziecięcym, a ich ciągła obecność w jelicie, połączona ze stymulacją podostrego stanu zapalnego i sekrecją TNF- α , indukuje rozwój ziarniniaków. Może to sprzyjać pozyskaniu cech patotypu AIEC.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

PIŚMIENNICTWO

- Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosal colonization in Crohn's disease. *J Clin Invest* 2007;117(6):1566–1574.
- Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M et al. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(6):872–882.
- Akazawa A, Sakaida I, Higaki S, Kubo Y, Uchida K, Okita K. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease, particularly in patients with disease in the inactive phase. *J Gastroenterol* 2002;37(5):345–353.
- Cravioto A, Tello A, Navarro A et al. Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet* 1991;337(8736):262–264.
- Falkow S, Small P, Isberg R, Hayes SF, Carwin D. A molecular strategy for the study of bacterial invasion. *Rev Infect Dis* 1987;9(5):450–455.
- Ieta K, Tanaka F, Utsunomiya T, Kuwano H, Mori M. CEACAM6 gene expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Brit J Cancer* 2006;95(4):532–540.
- Hrušák O, Trka J, Zuna J, Housková J, Bartunkova J, Starý J. Abberant expression of KOR-SA3544 antigen in children acute lymphoblastic leukemia predicts TEL-AML1 negativity. *Leukemia* 1998;12:1064–1070.
- Korczowski B, Romańczuk W, Korczowska E. Czynniki martwicy nowotworów alfa (TNF- α) w nieswoistych zapaleniach jelit. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2000;2(4):297–299.