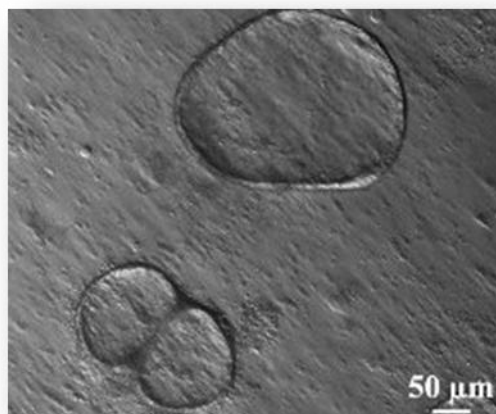


Projekt badawczy NCN 2013/09/B/NZ9/00285 realizowany w latach 2013-2017.

Kierownik projektu: dr Małgorzata Pierzchalska

„Wpływ bakterii probiotycznych oraz ligandów receptorów Toll-podobnych na wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych jelita cienkiego - badania w modelu organotypowej hodowli trójwymiarowej pochodzącej z zarodków kurzych”



Naukowcy zwracają ostatnio baczniejszą uwagę na mikrobiom jelitowy, czyli bakterie bytujące w jelitach, które wpływają w różnorodny sposób na zdrowie całego organizmu. Uważa się, że prawidłowa mikrobiota u młodych osobników stymuluje dojrzewanie przewodu pokarmowego do swoich zadań. Jest to szczególnie ważne u ptaków, które od razu po wykluciu z jaja pobierają pokarm podobny do tego, jaki pobierają dorosłe osobniki. Do badania takich zjawisk i procesów potrzebne są odpowiednie modele *in vitro* oparte na prowadzeniu hodowli komórkowych nabłonka jelitowego.

Receptory toll-podobne (TLR) to grupa białek błonowych, które rozpoznają wzorce molekularne – występujących w komórkach mikroorganizmów, ale

niepojawiających się w prawidłowych komórkach zwierząt wyższych. Na przykład lipopolisacharyd czy lipopeptydy ze ścian komórkowych bakterii są cząsteczkami łączącymi się odpowiednio z TLR4 i TLR2.

Celem podjętych badań było pokazanie, że wybrane ligandy niektórych receptorów TLR oraz probiotyczne pałeczki *Lactobacillus acidophilus* LA5, po dodaniu do hodowli, wpływają na wzrost i różnicowanie komórek w obrębie tak zwanych organoidów. Organoidy to mini-organy tworzące się spontanicznie poza organizmem w hodowli trójwymiarowej. Hodowle organoidów jelitowych („mini-jelitek”) prowadzono zanurzając fragmenty nabłonka z jelit dwunastodniowych zarodków kurzych w żelu złożonym z białek wypełniających normalnie w tkankach przestrzenie międzykomórkowe (substancja ta nosi nazwę handlową Matrigel™). Uzyskano sfery, których ściana zbudowana jest z nabłonka, w kontakcie z nią pozostają miofibroblasty – kurczliwe wrzecionowate komórki podobne do fibroblastów występujących w innych organach i śluzówkach (np. w skórze czy drogach oddechowych). Podobne organoidy uzyskano również zawieszając kroplę zawierającą nabłonek zarodkowych jelit w specjalnych wąskich kanalikach wielodołkowej płytki hodowlanej – w takich hodowlach siła ciężkości powoduje gromadzenie się wszystkich komórek w jednym miejscu, na dnie kropli. W tym przypadku jednak nie zaobserwowano obecności licznych miofibroblastów w tworzących się skomplikowanych strukturach złożonych z połączonych organoidów.

Okazało się ponadto, że jeśli do hodowli organoidów jelitowych kury dodamy składniki bakteryjnej ścianny lub całe żywe bakterie tworzą takie szybciej rosną, więcej komórek w ich obrębie dzieli się, a produkcja prostaglandyn (PGE₂ i PGD₂). Pojawienie się w tkance tych prostanoïdów wiąże się przeważnie z wystąpieniem stanu zapalnego, ale mogą one także stymulować komórki macierzyste nabłonka jelitowego do podziałów.

Poszukiwaliśmy również w komórkach organoidów niektórych receptorów typu TLR i potwierdziliśmy obecność TLR4 oraz dwóch wariantów TLR2 charakterystycznych tylko dla ptaków – nazywanych TLR2.1 i TLR2.2. Pokazaliśmy, że użyte ligandy wiążą się z tymi receptorami na komórkach organoidów w hodowli. Znakując fluorescencyjnie bakterie uwidoczniliśmy, że w naszych hodowlach – zwłaszcza tych w wiszącej kropli – bakterie znajdują się wewnątrz tworzących się sfer i mogą tam przetrwać przez wiele dni. Potwierdza to przydatność naszego modelu do badań nad wzajemną relacją między nabłonkiem jelit a bytującymi w jelitach mikroorganizmami, zarówno symbiotycznymi, jak i wywołującymi choroby. Liczymy pozwolić znaleźć odpowiednie sposoby badania probiotycznych dodatków do żywności i do pasz, co przyczyni się do potwierdzenia prozdrowotnego działania prawidłowego mikrobiomu jelit. Użycie komórek zarodkowych do tworzenia hodowli umożliwi badanie tego zjawiska również w kontekście jego znaczenia dla młodych osobników – noworodków ssaków i ptaków tuż po wykluciu. Poznanie roli receptorów TLR w nabłonku jelitowym powiększy naszą wiedzę na temat mechanizmów odpornościowych ptaków związanych ze śluzówkami, co może mieć znaczenie praktyczne dla hodowców drobiu.