Kwartalnik
Tom 60
Zeszyt 2•2021
KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:
PMKMAV 60 (2)
2021

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Impact Factor = 0,263 (2019)
Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOSŁAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

JAROSŁAW A. PANKOWSKI (Sekretarz)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski)
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM)
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324; fax 91 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki z rodzaju *Yersinia*.
Preparatyka: dr Jagoda Płaczkiewicz i dr hab. Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii Molekularnej,
Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Instytut Paleobiologii PAN Polskiej Akademii Nauk.
Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel.: 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 111–112

Wspomnienie o Pani Profesor Danucie Dzierżanowskiej

Pani Profesor Danuta Dzierżanowska-Madalińska była lekarzem, profesorem nauk medycznych, wybitnym mikrobiologiem. Jej krótka biografia dotycząca życia zawodowego przedstawia się następująco:

W 1963 roku ukończyła studia na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Białymstoku. Od grudnia 1966 do sierpnia 1978 pracowała jako asystent, a następnie adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Białymstoku. Zdobyła specjalizacje z mikrobiologii i immunologii klinicznej. Stopień doktora nauk medycznych uzyskała w roku 1970 na podstawie pracy na temat ruchomych elementów genetycznych (plazmidy R) u szczepów szpitalnych pałeczek *Klebsiella pneumoniae* determinujących oporność na β-laktamy. Doktorem habilitowanym nauk medycznych została w 1978 na podstawie pracy *Kompleksowa charakterystyka szczepów Pseudomonas aeruginosa odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne*. W 1992 otrzymała tytuł profesora nauk medycznych. Od września 1978 tworzyła i organizowała Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej w Instytucie „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka", gdzie do stycznia 2010 pracowała jako kierownik zakładu, a następnie jako konsultant kliniczny ds. terapii zakażeń. Pani Profesor Dzierżanowska wyszła ze specyficznego środowiska Akademii Medycznej w Białymstoku, w owych czasach bardzo upartyjnionego i z tej przyczyny oficjalnie popieranego, co na pewno nie sprzyjało rozwojowi naukowemu i zawodowemu młodej lekarki. Na szczęście udało się jej, nie bez wielkich oporów, wyrwać stamtąd do tworzonego właśnie Centrum Zdrowia Dziecka, gdzie została kierownikiem Zakładu Mikrobiologii, którym była aż do swojej emerytury. Od tego momentu zaczęła być znana i bardzo pozytywnie postrzegana w środowisku mikrobiologów. Dzięki swojej popularności została wybrana na prezesa Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, którym była przez dwie kadencje. W tym czasie Towarzystwo przeżywało swój bardzo dobry okres. Dlatego po zakończeniu swoich kadencji została wybrana członkiem honorowym Towarzystwa.

Bardzo dobrze oddają szczególne cechy osobowości Pani Profesor Danuty Dzierżanowskiej opinie środowiska lekarzy i mikrobiologów zebrane przez Stowarzyszenie Higieny Lecznictwa, które pozwalam sobie przytoczyć:

- Wielki autorytet
- Ogromna wiedza
- Chęć i umiejętność przekazywania wiedzy kolejnym pokoleniom mikrobiologów i lekarzy
- Łączyła w sposób doskonały dwa środowiska zawodowe: lekarzy i mikrobiologów, pokazując im, że są sobie potrzebni
- Uśmiech i elegancja
- Pracowitość
- Nauczycielka antybiotykoterapii polskich lekarzy i mikrobiologów
- Wymagająca szefowa, zachęcająca do zdobywania wiedzy i rozwoju
- Wiele pasji udzielających się innym
- Szerokie zainteresowania (przyroda, historia, podróże)
- Zawsze na pierwszym miejscu chęć pomocy potrzebującym
- Wrażliwość na los innych, dusza prawdziwego Chrześcijanina
- Ogromne zaangażowanie w akcje charytatywne
- Nie stwarzała dystansu, była zawsze blisko ludzi
- Jasny punkt na szarym niebie polskiej „profesury medycznej"

Pani profesor Dzierżanowska była bardzo dobrze znana w środowisku lekarskim przede wszystkim dzięki swoim książkom na temat antybiotykoterapii i zakażeń szpitalnych, przede wszystkim takim jak „Antybiotykoterapia praktyczna", czy „Przewodnik antybiotykoterapii", które doczekały się wielu wydań. Pierwsza z wymienionych sześciu, druga – aż dwudziestu pięciu. Była przy tym wierna jednemu wydawnictwu: Alfa-Medica Press z Bielska. W sumie napisała i wydała 8 podręczników i 2 poradniki, niektóre osiągnęły łączny nakład 40 000 egzemplarzy. Środowisko lekarskie znało również Panią profesor Dzierżanowską z jej niezwykłej gotowości do konsultowania przypadków zakażeń pod kątem ich diagnozowania i leczenia. Sam korzystałem z jej bardzo trafnych porad w przypadkach, co do których miałem wątpliwości. Pani profesor Dzierżanowska była jedną z najbardziej klinicznie nastawionych lekarzy mikrobiologów, często konsultowała przypadki zakażeń w szpitalach w całej Polsce. Ta aktywność stała się zresztą powodem, dla którego władze macierzystego Centrum Zdrowia Dziecka po przejściu Pani Profesor Dzierżanowskiej na emeryturę zatrudniły ją nadal u siebie na stanowisku konsultanta klinicznego do spraw terapii zakażeń. Jej praktyczne podejście do zawodu lekarza mikrobiologa obecnie jest prawdziwą rzadkością, a powinno być standardem zawodowym, odróżniających prawdziwą mikrobiologię kliniczną w wykonaniu lekarza od działań uzurpatorów nie mających wykształcenia medycznego, a mieniących się klinicznymi mikrobiologami. Z jej odejściem ta bardzo wątła już specjalność medyczna straci w znacznej mierze swoją reprezentację i znaczenie w społeczności lekarskiej.

Jako wybitny naukowiec Pani Profesor Dzierżanowska była wybierana do wielu gremiów naukowych nawet poza swoją specjalnością. Dzięki jej prawie stałemu uczestnictwu, bo w ciągu trzech kilkuletnich kadencji, w pracach Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów jako delegat Centrum Zdrowia Dziecka wielu kolegów z uczelni medycznych i instytutów Ministerstwa Zdrowia uzyskało zatwierdzenie swoich stopni doktora habilitowanego, czy tytułów profesora, bo zawsze i konsekwentnie popierała dobrych kandydatów, których sprawy tam trafiały.

Oprócz prezesowania Polskiemu Towarzystwu Mikrobiologów, Pani Profesor Dzierżanowska była członkiem komitetu wykonawczego International Society of Chemotherapy, a później członkiem European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Była członkiem kilku komitetów Polskiej Akademii Nauk grupujących ludzi nauki zajmujących się zakażeniami i ich leczeniem: Wydział II (Nauk Biologicznych, Komitet Mikrobiologii), Wydział VI (Nauk Medycznych, Komitet Immunologii i Etiologii Zakażeń Człowieka) oraz Prezydium PAN (komitet Badań nad Zagrożeniami). Jako profesor Centrum Zdrowia Dziecka była promotorką 14 doktoratów i opiekunką 15 mikrobiologów specjalizujących się z zakresu mikrobiologii i serologii. Jestem pewien, że wielkie zasługi Pani Profesor Dzierżanowskiej i jej niezwykła osobowość, która wywarła niezatarty wpływ na nas, jej kolegów będą trwały w pamięci nie tylko naszego pokolenia, ale i naszych następców.

Prof. dr hab. med. Piotr Heczko
Kraków, marzec 2021

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 113–119
DOI: 10.21307/PM-2021.60.2.09

CHARACTERISTICS AND REGULATION OF BIOFILM FORMATION IN *SALMONELLA*

Nefise AKÇELİK[1]*, Mustafa AKÇELİK[2]

[1] Biotechnology Institute, Ankara University, Gümüşdere Campus 06135 Ankara/Turkey
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University 06100 Ankara/Turkey

Received in February, accepted in May 2021

Abstract: The ability to from biofilms, which is a common feature in *Salmonella* serovars, is the main cause of persistent infections and permanent contamination in both clinical and industrial systems. Because the biofilm structures are significantly more resistant to environmental stress conditions than the planktonic forms of bacteria, it is often impossible to remove them through conventional disinfection or sterilization practices. Therefore, it has become necessary to develop effective strategies in combating biofilms, which are defined as the dominant form of microbial life. To achieve this goal, it is necessary to understand the genetic regulatory mechanisms that control the transition from planktonic form to the biofilm form and the related changes in gene expression. In this review, the current state of knowledge regarding gene regulation systems that affect the biofilm formation in *Salmonella,* has been summarized and discussed.

1. Introduction. 2. Regulation of biofilm formation in *Salmonella*. 2.1. *csgD*. 2.2. BarA / SirA and Csr system. 2.3. PhoPQ and RstA. 2.4. The interaction of cells in the biofilm structures through signal molecules. 2.5. sRNA's. 2.6. *dam* and *seqA*. 2.7. *MarT*. 3. Conclusion

K e y w o r d s: *Salmonella* Typhimurium, biofilm, genetic regulation

1. Introduction

Biofilm can be defined as a structured consortium attached to a living or inert surface, which is formed as a result of encircling microorganisms by the extracellular polymeric substance (EPS) produced by them [1]. Biofilms usually contain 10–25% cells and 75–90% EPS depending on the species that make up them [2]. As will be discussed later, EPS has much more function than a sticky substance that holds cells together. Enormous advances in omic technologies, molecular biology and computer technology have revolutionized biofilm research. The fact that no habitats are occupied by only one bacterial species emphasizes the importance of working with biofilms. The types of microorganisms found in different habitats are capable of establishing various forms of interaction and communication between them to create stable communities. All these determinations brought together the research of the structure, formation and regulation mechanisms of biofilms. Researchers have found that biofilms consisting of more than one species are more stable and exhibit a lower level of nutritional requirements than biofilms formed by single cell species [3, 4]. Also multi-species biofilms exhibited higher tolerance to disinfectants, antimicrobial agents and predation. With the light of these findings recent researches focus on autotrophic-heterotrophic interactions between various microbial species using chemical signals, other interactions, competition and cooperation [5].

EPS generally consists of polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids. These components form the three-dimensional polymer network structure that provides the mechanical stability of the biofilm, forming the adhesive form, adhering to a surface and communication between the cells forming the biofilm [2]. The purpose of the biofilm is to protect microorganisms from external factors or to gather nutrients within it. Biofilms are of great importance in the food industry due to their negative effects on both industrial production processes and health. The damage caused by microbial biofilms on medical and industrial tools and production surfaces, energy and product losses they cause in production processes and persistent recurrent infections are among the most important microbial problems in the world [6].

The use or control of any process or activity of biofilms for scientific or technological purposes is possible by knowing the formation and regulation of biofilms significantly. Biofilm formation is generally a multistage process. The first stage is the process of bacterial attachment to biotic or abiotic surfaces. This process is examined in two phases as reversible adhesion and irreversible adhesion. Although the bacterial cell is very close to the biotic and abiotic surface in reversible adhesion, it is the stage where no physical contact is provided. In this process, besides electrostatic forces, surface pH, nutrient concentration, temperature and hydrophobicity are also active. In addition, especially extracellular proteins attached to the surface may play

* Corresponding author: Mustafa Akçelik, Biotechnology Institute, Ankara University, Gümüşdere Campus 06135 Ankara/Turkey; e-mail: nefise.akcelik@ankara.edu.tr

a role in achieving the first physical contact with bacteria. In the irreversible adsorption – the second phase of the adsorption- dipole-dipole interactions, ionic and covalent bonds, hydrophobic interactions and hydrogen bonds play a critical role. After irreversible attachment, bacteria attached to the surface divide and form microcolonies. Many microcolonies can be produced in a biofilm structure depending on the number of bacteria attached to the surface from different regions. The bound cells are then matured and taken into the extracellular polymeric substance (EPS) produced by the cells that form the microcolonies. This EPS is responsible for the formation of the three-dimensional architectural structure and the stabilization of biofilms. Among the microcolonies within the EPS, a three-dimensional form of water channels and a primitive discharge system network, which serves in the transmission of food and waste, are formed. It has a linear or branched molecular structure formed by a repeating sugar (homopolysaccharides) or a mixture of different sugars (heteropolisaccharides). Although the EPS matrix varies according to the cell type that forms the biofilm; in general it contains 94–97% water, 1–2% extracellular nucleic acid and different lipids and 1–2% proteins. Biofilms that have completed their maturation are in the process of disintegration at the last stage. At this stage, the disruption of the enzymatic processes and matrix integrity due to other physical and chemical factors and the separation of planktonic cells from the biofilm matrix are involved [7] (Figure 1). In the light of the information obtained to date, it is believed that bacteria generally use environmental signals, flagella, outer membrane proteins, pili or lipopolysaccharides (LPS) for the formation of microcolonies and quorum sensing (QS) molecules to form biofilm structure [8]. However; many questions regarding genetic and biochemical mechanisms involved in the perception of the surface by bacteria and the production of different stages during biofilm formation have not yet been lightened yet [9].

Members of the food-borne *Salmonella enterica* species, belonging to the *Enterobacteriaceae* family, have the ability to form biofilms both on biotic and abiotic surfaces in their natural life cycle [10, 11]. It is imperative to target the biofilms created by these bacteria in minimizing the industrial problems they cause, in addition to the control and treatment of infections caused by *Salmonella* species in humans and animals, which have been identified with more than 2500 serotypes to date. Main components of extracellular polymeric matrix (EPS) in *Salmonella* biofilms are curli fimbria and cellulose. These components, together or individually; plays a key role in the attachment of the bacteria to a surface, cell clustering and the formation of the biofilm structure [12–16]. The expression of curli fimbria in *Salmonella* in most cases has common regulation systems with cellulose production in which cell to cell and cell to surface interactions work together [13].

One of the most important features that play a role in *Samonella* virulence is the biofilm forming properties of the serovarieties of this genus. Therefore, it is extremely important to define the genetic, physiological and biochemical properties and microbial community characteristics of the biofilm structures in question. In this review article, it is aimed to summarize the information available in the literature on *Salmonella* biofilms and to define future perspectives.

2. Regulation of Biofilm Formation in *Salmonella*

2.1. *csgD*

Salmonella members show a morphotype called "rdar" because of its red, dry and rough structure on agar containing Congo Red [17]. This biofilm form is

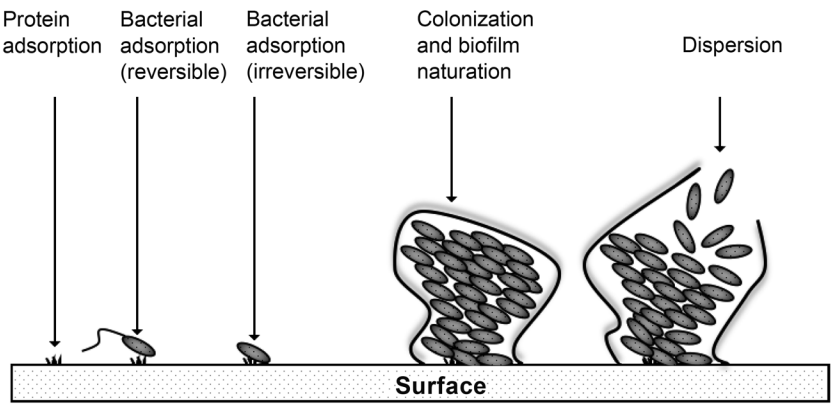


Fig. 1. Formation of bacterial biofilm structures

Adsorption of extracellular adhesive proteins to the biotic or abiotic surfaces; reversible adsorption: bacteria-protein interactions, electrostatic forces, pH, hydrophobicity, bacteri-surface interactions; irreversible adsorption: dipol:dipol interactions, ionic and covalent bonds, H bonds; Colonization and biofilm maturation: fimbrial structues and autotransporter proteins, exopolymeric matrix, microcolony organisation; Dispersion: Exopolymeric matrix degredation by physical, chemical agents and enzymes.

formed by the expression of the two main matrix compotents, cellulose and curli fimbria, of *Salmonella* [18–21]. The transcriptional regulator CsgD protein is the main regulator of the "rdar" morphotypes [13]. CsgD regulates the transcription of the *csgBAC* operon encoding the structural subunits of the curli fimbria and indirectly contributes to cellulose production by activation of *adrA* transcription [13, 22]. AdrA protein is a diguanylate cyclase that binds to cellulose and synthesizes secondary messenger cyclic diguanosine monophosphate (cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP) that activates cellulose. C-di-GMP regulates the *bcsABZC* operon encoding genes, transcribed during the cellulose biosynthesis, in the post-transcriptional phase by changing the concentration of c-di-GMP [13, 23].

csgD is an integral part of the curli fimbria biosynthesis system, which is created by different transcribing of *csgBAC* and *csgDEFG* operons. The CsgD transcriptional regulator contains an acceptor N-terminal region. There is a preserved aspartate (D59) in this region. The *csgD* mutant strains exhibit a "saw" (smooth and white; plain and white) phenotype in the Congo Red (CR) agar medium. Point mutations that may occur in the *csgD* promotor region (in the 521 bp region between the *csgB* and *csgD* genes) can convert the protected promoter region from a highly regulated form to a semi-conservative form [13]. As a result of passivating this gene in *csgD* insertion mutants, strains cannot form a pellicle structure in Luria Bertani (LB) broth, while ATM (adhesion test medium) can [20]. At the nucleotide and protein level, the high similarity of *S.* Typhimurium and *E. coli* curli fimbriae indicates that these genes evolved from a common ancestor. Comparative genetic analysis performed in the region between the *csgD-csgB* genes showed a high degree of similarity in all *Salmonella* members, with the exception of *S. bongori* strains. This is an indication that changes in the *csgD-csgB* intermediate region are caused by natural mutations caused by genetic drift. These mutations are observed more frequently in strains adapted to laboratory conditions and as a result of possible mutational effects, "rdar" morphotype is lost. This change can be seen as a result of passage of *Salmonella* strains in rich nutrient media and laboratory conditions for long generations and the "rdar" morphotype can be lost. In wild type strains, these mutational changes are seen less frequently [24].

There is a strong relationship between activation of *csgD* and STM2123 and STM3388 (proteins containing complex GGDEF / EAL domain, respectively) proteins. STM2123 is a component needed for activation of *csgD* at the first step of biofilm formation. STM3388 protein, on the other hand, was found to have contributed positively to the formation of the biofilm since the stage when the biofilm began to mature. Proteins containing four other important EAL domains found in *S.* Typhimurium (STM1703, STM1827, STM3611 and STM4264) show similar activity in the expression of *csgD*. In some studies with the mutants of these proteins, a significant increase was also detected in the expression of *csgD* due to the increase in c-di-GMP at the cellular level was determined. In this context, the view has arisen that cellular c-di-GMP levels can control different targets in regulation of these proteins and biofilm formation [23].

These data are emphasizes that c-di-GMP plays an important role in virulence and mobility in biofilm formation due to its role in curli fimbria and cellulose biosynthesis via *csgD* [20].

2.2 BarA / SirA and Csr system

The BarA / SirA system is a widely conserved system in gamma-proteobacteria [25]. SirA is a response regulator that is a member of the FixJ family proteins. BarA, on the other hand, act as a sensor kinase specific to SirA. It is known that bile salts and short chain fatty acids in the environment affect the BarA / SirA system in *Salmonella*. The SirA protein has also been found to be responsible for the transcriptional activation of csrB and csrC sRNAs, which are regulators of *Salmonella* invasion. This indicates that sirA controls host cell invasion of *Salmonella* [26–28].

In the study carried out by Teplitski et al. [25]; it was determined that *sirA*, *fimI, csrB* and *csrC* binary mutants could not perform biofilm formation on plastic surfaces. On the other hand *flhDC* mutants could form much more biofilm. In this study, the regulatory roles of SirA at the transcriptional level and the post-transcriptional level of the Csr system on the expressions of flagellar or type I fimbrial components that positively or negatively contribute to biofilm formation were clarified. Phosphorylated SirA-P activates *csrB* and *csrC*, *fim* operon and *hilA* at the transcriptional level. Increased *csrB* / *csrC* level inhibits CsrA activity. Reduced CsrA activity promotes biofilm formation by causing a decrease in expressions of factors that can inhibit biofilm formation, such as FlhDC and HilA proteins. CsrA also reduces film expression. The decrease in the activity of CsrA allows for more type I fimbria biosynthesis to be realized in this context and to have more biofilm production.

2.3. PhoPQ and RstA

Salmonella PhoPQ system is a binary system consisting of the cytoplasmic response regulator PhoP and the sensor kinase PhoQ localized in the inner membrane [29]. As a result of PhoP activation, LPS modification is controlled by direct or indirect expression of more than 120 genes associated with many functions such as magnesium transport, invasion of epithelium cells and survival within macrophages [29, 30]. It is

known that the phoP mutant strains of *S.* Typhimurium produce better biofilm compared to wild type strains. This mutation is also capable of increasing biofilm production on glass slides. These data clearly show that the PhoPQ system suppresses biofilm formation in *S.* Typhimurium. It was also that *prgH* may be associated with PhoPQ dependent biofilm regulation and determined that mutant *Salmonella* strains in terms of *prgH* gene could not form mature biofilms on gallstones and glass surfaces [29].

Another factor contributing to PhoPQ dependent biofilm regulation is the indirect regulation of RpoS by the PhoPQ system. As mentioned before, besides biofilm formation RpoS also regulates the synthesis of CsgD and mobility-related elements at the transcriptional level. PhoP can stabilize RpoS by acting as a transcriptional activator of *iraP*. *iraP* provides stabilization of RpoS by encoding a product that interacts with RssB [31]. PhoP also activates RstA's expression [32]. This protein indirectly induces the breakdown of RpoS by the ClpXP-SsrB proteolytic pathway. RstA is the response regulator of the RstA / RstB binary system. The opposite effects of IraP and RstA play an active role in regulating RpoS's expression based on extracellular signals. Activation of RstA by PhoP may offer other alternatives to PhoPQ dependent biofilm regulation. Unlike its effects on RpoS, RstA also affects the expression of *bapA*. High expression of RstA in *E. coli* leads to negative regulation by connecting RstA to the *csgD* promoter [33]. The presence of RstA's binding motif in the *csgD* operon in *Salmonella* proves that RstA directly inhibits the expression of *csgD* [34].

2.4. The interaction of cells in the biofilm structures through signal molecules

Biofilm forming is not a random event where bacteria only get together, attach to significant surface then adhere there and maintain their lives together with the other species on that surface. Many organisms give signals to each other to coordinate their activities, use little signal molecules. With the process called quorum sensing (QS) which is an important mechanism in biofilm forming, bacteria can measure the signal molecule density they produce, sense the amount of other microorganisms around them and enable to transfer this data to other bacteria [35]. In another words with QS, bacteria determine the bacterial population in their environment. As increasing the amount of bacteria attaching to the surface, this signal's local concentration increase and with this increase, a number of processes direct begining of biofilm forming. So, bacteria in the structure of biofilm contact to each other through the low molecular weighted messengers. QS also has some important regulative roles at synthesizing antibiotic, virulence factor formation, reproducing, spore forming, cell separation and pathogen bacterial infections [36]. This mechanism which provides cellular interaction is regulated by auto-inducer (AI) molecules [37].

The reason why QS molecules are expressed as auto-inducer since they show regulative effect on the cell metabolism where they are produced [38]. Some microorganisms use more than one different QS molecule. QS takes place in two ways as between species and inner species. Gram negative bacteria use N-acyl homoserine lactone (AHL, AHLs, acyl-HSL or HSL), Gram positive bacteria mostly use oligo-peptides as an auto-inducer in QS mechanism [39]. Beside this, the usage characteristics of auto-inducer signal molecules in QS system of Gram negative and positive bacteria are mutual. In the studies conducted on QS systems it was determined that *S. enterica* has actualized the cellular interaction through auto-inducer signals [38].

Besides the formation of single and multi-species biofilm structures; symbiosis also plays an important role in the control of other social / physiological behaviors such as the formation of spore, bacteriocin production, genetic competence, programmed cell death, and virulence [40]. This intracellular communication process was first described in the marine bacteria *Vibrio fischeri*, which produces bioluminescence. In this system, bacteria communicate by producing, detecting, and responding to small diffusable signal molecules called autoinducers. The bacterial QS system is generally divided into three types: 1) The LuxI / LuxR system in which Gram-negative bacteria use acyl homoserine lactones (AHL) as signal molecules 2) Two-component-oligopeptide system at which Gram-positive bacteria use small peptides as oligopeptide signaling molecules and 3) Autoinducer-2 (AI-2) system, encoded by luxS, common in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Each signal system type is detected and responded by the correct sensing element and regulatory control [41, 42].

2.5. sRNA's

Small RNAs (sRNA) are non-coding RNA molecules produced by bacteria that can be 50 to 250 nucleotides in length. Different studies have found that biofilm formation is influenced by the production of sRNA molecules in various *S. enterica* serovar Typhimurium mutants [43]. The sRNA is encoded in the same region as the QS syntase (LuxS). MicA is a family of highly preserved small RNA molecules in some Enterobacteriaceae members. It has been determined that members of this small RNA family are a regulatory mechanism for biofilm formation in many bacterial species and play a critical role in the development of mature *Salmonella* biofilms by adjusting the level of balanced expression

[44]. To date, at least six sRNAs (*arcZ, sroC, csrB, dsrA, oxyS,* and *rprA*) associated with biofilm formation in *Salmonella* and its closely related bacteria have been identified. These can be divided into two groups as positively regulating biofilm formation and negatively regulating biofilm formation. *arcZ, sroC* and *csrB* are sRNAs that positively regulate biofilm formation and were observed to be significantly down-regulated in anaerobiosis. However, in microaerobiosis, no significant difference of these three sRNAs was observed. Additionally, *dsrA, oxyS* and *rprA* are sRNAs that negatively regulate biofilm formation. These three exhibited differences in transcription patterns, both based on atmospheric oxygen level and culture medium [43, 45, 46].

The function of sRNAs in regulating biofilm formation occurs through two general mechanisms: sRNAs that act via base pairing with other RNAs and protein binding. Protein binding sRNAs mimic the protein binding sequences found in various mRNAs, antagonizing and separating their cognate regulatory proteins. Base pairing sRNAs are categorized as cis or trans in their position within the bacterial genome relative to their mRNA targets. The sRNAs that are copied from the DNA strand directly opposite the mRNA targets are called cis-encoded sRNAs. cis-encoded sRNAs generally add extensive complementarity to their targets. In contrast, trans-coded sRNAs reside elsewhere on the genome, function as transduced molecules and add only limited (10–25 bp) complementarity to base pairing interactions [43, 47, 48].

2.6. *dam* and *seqA*

DNA methylation status in specific GATC sequences in promoters of some genes besides the *dnaA* gene can activate or suppress transcription by affecting the binding of RNA polymerases or transcription factors [49–51]. It has been determined that the SeqA protein regulates the transcription of some genes in bacteria, just like the Dam methylase enzyme. It performs this function through a GATC methylation or by acting as a co-activator [52]. It has been found that Dam and SeqA activity is involved in the regulation of different genes in *Salmonella*, and in mutants of the *dam* and *seqA* genes, attachment to host cells and especially host cell invasion is significantly reduced [53–57]. However, few studies have been conducted describing the effect of Dam methylation on biofilm formation in *Salmonella* [58, 59]. Aya Castaneda et al. (58) found that DNA methylation in *S.* Enteritidis increased the expression of biofilm production factors such as cellulose and pleated fimbria by modifying *csgD* expression. However, only at one study it was found that *seqA* genes are not effective in biofilm formation [59].

Uğur et al. [60] found that the biofilm forming ability on steel and polystyrene surfaces in *dam* gene mutants of different *Salmonella* serovars significantly decreased compared to wild type strains. When the *dam* gene is cloned into a pBAD24 vector containing a promoter induced in the presence of arabinose, recovery of the biofilm-forming ability to the same mutants gives certainty to the findings of the *dam* mutation. On the other hand, for the first time in this study, it was determined that the SeqA protein played a role in the regulation of biofilm formation in *Salmonella* serovars. The same results were obtained when the verification tests of biofilm formation on steel and polystyrene surfaces were performed with *seqA* mutants using the pBAD24 vector mentioned above. In the light of these findings, it has been suggested that the *dam* and *seqA* genes carry out their biofilm regulation activities by changing the activities of RNA polymerase or transcription factors in the promoter regions. Studies carried out in wild strain *S.* Typhimurium 14028 and its dam and *seqA* mutants have proven that these genes are effective in the regulation of many genes related to biofilm formation, virulence and motility (Akçelik, M. unpublished data)

2.7. *marT*

The MarT protein, a close homologue of the ToxR-like regulatory protein family, was first identified by Tükel et al. [61] as a positive regulator of the misL autotransporter protein in *S.* Typhimurium. Later as a result of microarray studies conducted by Akkoç et al. [62], using *S.* Typhimurium 14028 wild type strain and *marT* mutant, it was determined that the gene in question could be a positive regulator of many properties related to bacterial physiology. In the latest sudy, Eran et al. [63] determined that the *marT* gene is a positive regulator of 14 genes in *Salmonella*, called *fimA, fimD*, *fimF*, *fimH*, *stjB*, *stjC*, *csgA*, *csgD*, *ompC*, *sthB*, *sthE*, *rmbA*, *fliZ* and *yaiC*. As a result of QRT-PCR studies, it has also been proven that the protein encoded by the *marT* gene is an autoregulator that positively regulates its own promoter. All these data indicate that the MarT protein not only regulates *misL* gene expression but also acts as a global regulator in *Salmonella*. When the participation of these genes subjected to *marT* gene regulation to biofilm formation on polystyrene surfaces was examined, it was determined that the biofilm production capacity in mutant strains for each gene was statistically significantly decreased ($p = 0.05$). These results showed that all genes tested were associated with biofilm production.

3. Conclusion

Biofilms are the main cause of persistent contaminations, which evoke serious economic losses and hygienic problems in the food industry and medicine.

Improperly cleaned food production surfaces contribute to biofilm formation for different food spoilage bacteria and food-borne pathogens such as *Salmonella*, possessing high adhesive characteristics for biotic and abiotic materials. Detached cells from biofilms, yielding by the effects of the aerosols from contaminated equipments and products flow from contaminated surfaces, create cross contamination. Thus, development of effective strategies to prevent biofilm formation and to eradicate mature biofilm forms from food producing environments are crucial for food industry and human health. Understanding the molecular patterns of biofilm formation and determining the biofilm behavior under different environmental conditions and disinfection applications, are necessary to developt these effective antibiofilm strategies.

References

1. Nadell C.D., Xavier J.B., Foster K.R.: The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**: 206–224 (2009)
2. Flemming H.C., Wingender J.: The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol*. **8**, 623–633 (2010)
3. Burmolle M, Webb J.S, Rao D., Hansen L.H., Sorensen S.J., Kjelleberg S.: Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*. **72**, 3916–3923 (2006)
4. Ren D., Madsen J.S., Sorensen S.J., Burmolle M.: High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME J.* **9**, 81–89 (2015)
5. Fiegna F., Moreno-Letelier A., Bell T., Barraclough T.G.: Evolution of species interactions determines microbial community productivity in new environments, *ISME J*. **9**, 1235–1245 (2015)
6. Fujishige N.A., Kapadia N.N., Hirsch A.M.: A feeling for the microorganism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Bot. J. Linnean Soc.* **150**, 79–88 (2006)
7. Kim S. J., Chang J., Rimal B., Yang H., Schaefer J.: Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 749–756 (2018)
8. Rinaudi L.V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett*. **304**. 1–11 (2010)
9. Armbruster C.R., Parsek M.R.: New insight into the early stages of biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 4317–4319 (2018)
10. Prouty A.M., Gunn J.S.: Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, **71**, 7154–7158 (2003)
11. Ledeboer N.A., Jones, B.D.: Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *J. Bacteriol. 187*: 3214–3226 (2005)
12. Olsen A., Arnqvist A., Hammar M., Normark S.: Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect. Agents Dis*. **2**, 272–274 (1993)
13. Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune, P.: Isolation of an *Escherichia coli* K12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* **180**, 2442–2449 (1998)
14. Romling U., Bokranz W., Rabsch W., Zogaj X., Nimtz M., Tschape H.: Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 273–285 (2002)
15. Prigent-Combaret C., Brombacher E., Vidal O., Ambert A., Lejeune P., Landini P., Dorel C.: Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol*. **183**, 7213–7223 (2001)
16. Cookson A.L., Cooley W.A., Woodward M.J.: The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int. J. Med. Microbiol*. **292**, 195–205 (200).
17. Monteiro C., Fang X., Ahmad I., Gonelsky M., Römling U.: Regulation of biofilm components in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by lytic transglycosylases involved in cell wall turnover. *J. Bacteriol.* **193,** 6443–6451 (2011)
18. Collinson S.K., Clouthier S.C., Doran J. L., Banser P.A., Kay W.W.: *Salmonella enteritidis agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* **178**, 662–667 (1996)
19. Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Romling U.: The multicellular morphotypes of *Salmonella* typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39,** 1452–1463 (2001)
20. Solano C., Garcia B., Valle J., Berasain C., Ghigo J.M., Gamazo C. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: Critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* **43**, 793–808 (2002)
21. Römling, U.: Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1234–1246 (2005)
22. Zakikhany K., Harrington C.R., Nimtz M., Hinton J.C.D., Romling U.: Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **77**, 771–786 (2010)
23. Simm R., Morr M., Kader A., Nimtz M., Romling U.: GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53,** 1123–1134 (2004)
24. Davidson C.J., White A.P., Surette, M.G.: Evolutionary loss of the rdar morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. *The ISME Journal*, **2**, 293–307 (2008)
25. Teplitski M., Al-Agely A., Ahmer B.M.: Contribution of the *sirA* regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, **152**, 3411–3424 (2006)
26. Altier C., Suyemoto, M., Ruiz A.I., Burnham K.D., Maurer R.: Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol. Microbiol.* **35**, 635–646 (2000)
27. Pernestig A.K., Melefors O., Georgellis D.: Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 225–231 (2001)
28. Lawhon S.D., Maurer R., Suyemoto M. Altier C.: Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* **46**, 1451–1464 (2002)
29. Kato A., Groisman E.A.: The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology,* **631**, 7–21 (2008)
30. Charles R.C., Harris J.B., Chase M.R., Lebrun L.M., Sheikh A., LaRocque R.C.: Comparative proteomic analysis of the PhoP regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhi versus Typhimurium. *PLoS ONE*, **4**, e6994 (2009)
31. Tu X., Latifi T., Bougdour A., Gottesman S., Groisman E.A.: The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative

sigma factor RpoS in *Salmonella enterica*. *NAS*, **103**, 13503–13508 (2006)
32. Choi E., Groisman E.A., Shin D.: Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake. *J. Bacteriol.* **191**, 7174–7181 (2009)
33. Cabeza M.L., Aguirre A., Soncini F.C., Vescovi E.G.: Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **189**, 7335–7342 (2007)
34. Ogasawara H., Hasegawa A., Kanda E., Miki T., Yamamoto K., Ishihama A.: Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J. Bacteriol.* **189**, 4791–4799 (2007)
35. Camara M., Williams P., Winzer K., Chan W.C.: Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. T. R. Soc. Biol. Sci.* **362**, 1119–1134 (2007)
36. March J. C., Bentley WE.: Quorum sensing and bacterial cross--talk in biotechology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 495–502 (2004)
37. Asad S., Opal S.M.: Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care.* **12**, 236–242 (2008)
38. Donabedian H.: Quorum Sensing and its Relevance to infectious diseases. *J Infect.* **46**, 207–214 (2003)
39. Wong C.S., Koh C., Sam C., Chen J.W., Chong Y.M., Yin W., Chan K.: Degradation of Bacterial Quorum Sensing Signaling Molecules by the Microscopic Yeast Trichosporon loubieri Isolated from Tropical Wetland Waters. *Sensors* (*Basel*), **13**, 12943–12957 (2013)
40. Parsek M.R., Greenberg E.P.: Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms, *Trends Microbiol.* **13**, 27–33 (2005)
41. Federle M.J., Bassler B.L.: Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**, 1291–1299 (2003)
42. Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.: Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol*. **14**, 563–575 (2016)
43. Jennings M.E., Quick L.N., Soni A., Davis R.R., Crosby K., Ott C.M., Nickerson C.A., Wilson J.W.: Characterization of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ydcI* gene, which encodes a conserved DNA binding protein required for full acid stress resistance. *J. Bacteriol.* **193**, 2208–2217 (2011)
44. Sheffield C.L., Crippen T.L., Andrews K., Bongaerts R.J., Nisbet D.J.: Planktonic and biofilm communities from 7-day-old chicken cecal microflora cultures: characterization and resistance to *Salmonella* colonization. *Journal of Food Protection*, **72**, 1812–1820 (2009)
45. Chambers J. R., Sauer K.: Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends in Microbiology*, **21**, 39–49 (2013)
46. Lamas A., Regal P., Vázquez B., Miranda J.M., Cepeda A., Franco C.M.: Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. *Food Control*, **90**, 1–9 (2018)
47. Bak G., Lee J., Suk S., Kim D., Young Lee J., Kim K., Lee Y.: Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility and fimbriae formation in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, **5**, 15287–15306 (2015)
48. Zhou Y., Smith D.R., Hufnagel D.A., Chapman M.R.: Experimental manipulation of the microbial functional amyloid called curli. *Methods Mol. Biol.* **966**, 53–75 (2013)
49. Polaczek P., Kwan K., Campbell J.L.: GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N6-adenine methylation status: possible implications for DNA--protein recognition. *Mol. Gen*. **258,** 488–493 (1998)
50. Oshima T.C., Wada Y., Kawagoe T., Ara M., Maeda Y., Masuda S., Hiraga H.: Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. **45**, 673–695 (2002)
51. Robbins-Manke J.L., Zdraveski Z.Z., Marinus M., Essigman J.M.: Analysis of global gene expression and double-strand-break formation in DNA adenine methyltransferase- and mismatch repair--deficient *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 7027–7037 (2005)
52. Prieto A. I., Jakomin M., Segura I., Pucciarelli M. G., Ramos--Morales F., del Portillo F.G., Casadesus J.: The GATC-binding protein SeqA is required for bile resistance and virulence in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **189**, 8496–8502 (2007)
53. García-del-Portillo F., Pucciarelli M. G., Casadesús J.: DNA adenine methylase mutants of *Salmonella* Typhimurium are deficient in protein secretion, cell invasion and M cell cytotoxicity. *PNAS*, **96**, 11584–11588 (1999)
54. Heithoff D.M., Sinsheimer R.L., Low D.A., Mahan M.J.: An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science*, **284**, 967–970 (1999)
55. Chatti A., Daghfous D., Landoulsi A.: Effect of *seqA* mutation on *Salmonella* typhimurium virulence. *J. Infect.* **54,** 241–245 (2007)
56. Chatti A., Aloui M., Tagourti J., Mihoub M., Landoulsi A.: Novobiocin sensitivity of *Salmonella typhimurium dam* and/or *seqA* mutants. *Polish Journal of Microbiology*, **63**, 51–56 (2014)
57. Jakomin M., Chessa D., Baumler A.J., Casadesus J.: Regulation of *the Salmonella enterica std* Fimbrial Operon by DNA Adenine Methylation, SeqA, and HdfR. *J. Bacteriol.* **190**, 7406–7413 (2008)
58. Aya Castaneda M.R., Sarnacki S.H., Noto L.M.: Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Int. *J. Food Microbiol.* **16**, 15–22 (2015)
59. Uğur S., Akçelik M., Yüksel F.N., Karatuğ N.T., Akçelik M.: Effects of *dam* and *seqA* genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Patgohens And Global Health,* **112**, 368–377 (2018)
60. Tükel Ç, Akçelik M., de Jong M.F., Şimşek Ö., Tsolis R.M., Baumler A.J.: MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Bacteriol.* **189**, 3922–3926 (2007)
61. İlçe B.Y., Akçelik N.: The effect of *marT* gene on biofilm production of *Salmonella* Typhimurium. *Turk. J. of Biol.* **39**, 722–731.
62. Eran Z., Akçelik M., Özcengiz G., Akçelik N.: Regulation of biofilm formation by marT in *Salmonella* Typhimurium. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 5041–5050 (2020)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 121–135
DOI: 10.21307/PM-2021.60.2.10

KORONAWIRUSY – JAK INTERAKCJE KILKU BIAŁEK ZMIENIŁY NASZE POSTRZEGANIE ŚWIATA

Jolanta Bratosiewicz-Wąsik[1]*, Tomasz J. Wąsik[2]

[1]Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
[2] Katedra i Zakład Mikrobiologii i Wirusologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w maju 2021 r.

Streszczenie: Koronawirus 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) jest trzecim po koronawirusie ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) i koronawirusie środkowo-wschodniego zespołu oddechowego (MERS-CoV – Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), koronawirusem, który w XXI wieku pokonał barierę międzygatunkową wywołując u człowieka ciężkie schorzenie określane jako COVID-19 (coronavirus disease-19). Praca niniejsza prezentuje najnowsze informacje na temat biologii koronawirusów, co ma pomóc w zrozumieniu wielu zagadnień związanych z zakaźnością SARS-CoV-2 i patogenezą COVID-19 oraz usystematyzować najnowsze informacje dotyczące tych zagadnień. Na wstępie przedstawiono podstawowe informacje dotyczące taksonomii, budowy i replikacji koronawirusów stanowiące podstawę dla dalszych rozważań. Następnie wyjaśniono zjawiska molekularne umożliwiające koronawirusom pokonanie bariery międzygatunkowej. Dalsza część pracy poświęcona została mechanizmom oddziaływania pomiędzy koronawirusami i receptorami komórkowymi stanowiącymi czynnik warunkujący tropizm gatunkowy i tkankowy oraz przebieg kliniczny zakażenia. Szczególną uwagę poświęcono receptorom komórkowym, peptydazie dwupeptydylowej IV oraz konwertazie angiotensyny typu 2, oddziałującym z białkiem S koronawirusów oraz proteazom komórkowym zaangażowanym w proteolizę biała S. Czynniki te determinują wejście wirusa do komórki oraz jego replikację i każda nawet niewielka zmiana jakościowa lub ilościowa w ekspresji tych czynników może mieć wpływ na przebieg zakażenia. W pracy omówiono również mechanizmy odpowiedzi układu odpornościowego na zakażenie koronawirusami istotne w patogenezie COVID-19.

1. Wprowadzenie. 2. Patogeneza i patofizjologia COVID-19. 3. Charakterystyka koronawirusów. 3.1. Systematyka. 3.2. Morfologia. 3.3. Białko S. 3.4. Replikacja. 4. Jak koronawirusy pokonują barierę międzygatunkową? 5. Receptory komórkowe dla koronawirusów. 5.1. Peptydaza dwupeptydylowa IV. 5.2. Konwertaza angiotensyny typ 2. 6. Procesowanie proteolityczne białka S. 7. Mechanizmy immunopatogenezy indukowanej zakażeniem SARS-CoV-2. 7.1. Burza cytokinowa. 7.2. Wyniszczenie i zmniejszenie liczebności limfocytów. 7.3. Wzrost liczebności neutrofili. 7.4. Wzmocnienie zależne od przeciwciał. 8. Podsumowanie

CORONAVIRUSES – HOW PROTEIN INTERACTIONS CHANGED OUR PERCEPTION OF THE WORLD

Abstract: The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the third, following SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) and Middle East Respiratory Syndrome-CoV (MERS), zoonotic coronavirus that has crossed the species barrier in XXI century resulting in the development of serious human infection termed COVID-19 (coronavirus disease-19). However, there are still many unanswered questions about its transmissibility and pathogenesis, what impelled us to gather the most recent facts about the nature of coronaviruses. At first we introduced the basic information about coronavirus taxonomy, structure, and replication process to create the basis for more advanced consideration. We also put across the molecular basis of the strategy used by coronaviruses to cross the species barrier. In the following part of this review we focused on the interactions between the virus and the receptor on the host cell, as this stage is the critical process determining the species and tissue tropism, as well as clinical course of infection. The special attention was paid to the cellular receptors interaction with S protein of different CoVs (dipeptidyl peptidase IV and angiotensin-converting enzyme 2) as well as the cellular proteases involved in proteolysis of this protein. These factors determine the virus entry and replication, thus even the fine quantitative or qualitative difference in their expression may be crucial for outcome of infection. We also considered the host immune response and viral evasion mechanisms which would be helpful to understand COVID-19 pathogenesis. We wish the information provided by this review may be helpful to understand virus biology and to develop efficient therapeutic and preventive strategies.

1. Introduction. 2. Pathogenesis and pathophysiology of COVID-19. 3. Nature of coronavirus. 3.1. Taxonomy. 3.2. Morphology. 3.3. S protein. 3.4. Replication. 4. How can coronaviruses cross the species barrier? 5. Cellular receptors for coronaviruses. 5.1. Dipeptidyl peptidase IV. 5.2. Angiotensin-converting enzyme 2. 6. Spike protein cleavage. 7. Mechanisms of immunopathogenesis induced by SARS-CoV-2. 7.1. Cytokine storm. 7.2. Depletion and exhaustion of lymphocytes. 7.3. Increased neutrophils. 7.4. Antibody-dependent enhancement. 8. Summary

Słowa kluczowe: ACE2, COVID-19, DPP4, koronawirus
Keywords: ACE2, COVID-19, DPP4, coronavirus

* Autor korespondencyjny: Jolanta Bratosiewicz-Wąsik, Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; tel. +48 32 364 1242; e-mail: jbrat@sum.edu.pl

1. Wprowadzenie

Na przełomie 2019 i 2020 roku uwaga mieszkańców całego świata skierowana została na nowego koronawirusa nazwanego SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) wywołującego epidemię zapalenia płuc COVID-19 (COronaVIrus Disease 19), który pojawił się w prowincji Wuhan w centralnych Chinach. W niedługim czasie wirus opanował ludność całego świata i w marcu 2020 roku Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła COVID-19 pandemią. SARS-CoV-2 jest trzecim w XXI wieku koronawirusem pochodzenia odzwierzęcego, który pokonał barierę międzygatunkową wywołując zakażenia człowieka o ciężkim przebiegu. Koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) zaatakował w latach 2002–2003 w prowincji Guangdong w Chinach zakażając 8 096 osób i doprowadził do śmierci 774 osób osiągając współczynnik śmiertelności wynoszący 9,5% [93]. W 2012 roku w Arabii Saudyjskiej zaatakował koronawirus środkowo-wschodniego zespołu oddechowego (MERS-CoV – Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) odznaczający się wysokim, sięgającym 34% współczynnikiem śmiertelności, bowiem spośród 2 494 osób zakażonych zmarło 858 pacjentów. Po mającym miejsce w 2014 roku szczycie epidemii, MERS-CoV pozostał w krajach środkowego wschodu, przede wszystkim w Arabii Saudyjskiej, wywołując kilkaset przypadków zachorowań rocznie [92]. Ostatnio w regionie Wuhan pojawił się kolejny wirus nazwany koronawirusem 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) wywołujący ciężkie schorzenie układu oddechowego określone jako COVID-19. Do dnia 16 lutego 2021 roku COVID-19 potwierdzono u 108 822 960 osób, zmarło 2 403 641 zakażonych w 235 krajach świata [97].

Wszystkie trzy wspomniane schorzenia są skutkiem zakażenia wirusami pochodzenia odzwierzęcego. Dane epidemiologiczne, genetyczne i filogenetyczne wskazują, że ich źródłem są nietoperze, z których na człowieka przeniesione zostały przez zwierzęta domowe, takie jak krowy, świnie, czy wielbłądy. Ponadto badania immunologiczne i molekularne wykazały, że dzikie zwierzęta takie jak łaskuny palmowe i jenoty sprzedawane na tzw. mokrych targach w Azji są rezerwuarem pośrednim koronawirusów [34].

Poza wspomnianymi SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2, człowiek zakaża się również innymi koronawirusami (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 i HCoV-HKU1) odpowiedzialnymi za rozwój infekcji górnych dróg oddechowych o łagodnym lub umiarkowanie nasilonym przebiegu u osób immunokompetentnych. Natomiast u osób o obniżonej odporności zakażenie może przybierać postać ciężką. Badania genetyczne dowiodły, że od zwierząt pochodzą następujące koronawirusy: od gryzoni HCoV-OC43 i HCoV-HKU1, a od nietoperzy HCoV-229E i HCoV-NL63 [26, 82].

2. Patogeneza i patofizjologia COVID-19

Podobnie jak inne koronawirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego SARS-CoV-2 przenoszony jest głównie drogą kropelkową. Możliwa, choć nieudowodniona, jest również transmisja drogą fekalno-oralną, gdyż u pacjentów, u których występują wymioty i biegunka, RNA wirusa wykrywany jest w kale [37]. Zakażenie może przebiegać w formie bezobjawowej, z objawami o średnim nasileniu, a w 20% przypadków przebieg zakażenia jest na tyle ciężki, że wymaga hospitalizacji. Śmiertelność w skali świata wynosi około 2,2% i różni się w regionach w zależności od systemu opieki zdrowotnej.

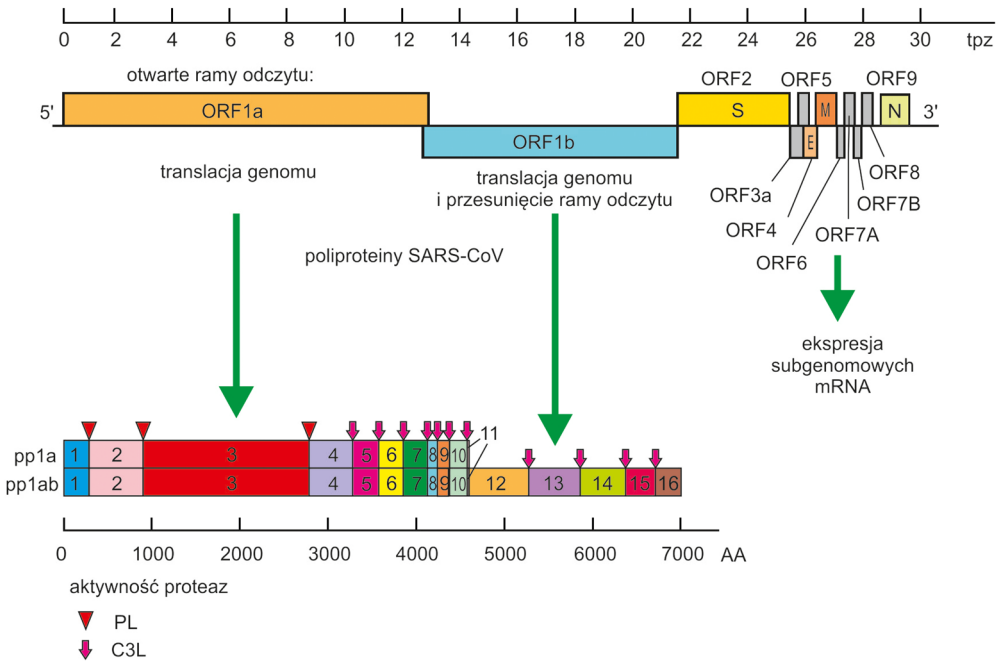
Średni okres inkubacji poprzedzający wystąpienie objawów zakażenia wynosi 4–5 dni, średni czas trwania okresu objawowego wynosi 11 dni, natomiast od momentu wystąpienia objawów do zgonu upływa średnio 14 dni [35, 51, 57]. Najczęściej występującymi objawami zakażenia SARS-CoV-2 są gorączka sięgająca 38.5°C i suchy kaszel, rzadziej pojawiają się trudności w oddychaniu, bóle stawowo-mięśniowe, bóle i zwroty głowy, zaburzenia smaku i węchu, biegunka, nudności i wymioty [10, 35]. W ciężkim przebiegu COVID-19 około 8–9 dnia od wystąpienia objawów dochodzi do rozwoju zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ARDS –acute respiratory distress syndrome) [40].

Nasilenie objawów zakażenia SARS-CoV-2 jest wynikiem nie tyle bezpośredniego cytolitycznego działania wirusa, ile odpowiedzi organizmu gospodarza na zakażenie. Szacunki wskazują, że w około 70% przypadków śmierć spowodowana jest zespołem ostrej niewydolności oddechowej. Następujące w odpowiedzi na zakażenie wydzielanie przez komórki efektorowe układu immunologicznego cytokin może przyjmować gwałtowną postać nazwaną burzą cytokinową prowadzącą do sepsy i stanowiąc przyczynę około 28% zgonów pacjentów z COVID-19 [103].

3. Charakterystyka koronawirusów

3.1. Systematyka

Zgodnie z danymi Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów koronawirusy należą do podrodziny *Orthocoronavirinae* w rodzinie *Coronaviridae* w rzędzie *Nidovirales*. Porównanie sekwencji genomu przeprowadzone w podrodzinie *Orthocoronavirinae*



Ryc. 1. Schemat genomu koronawirusów

Na 5' końcu genomu znajdują się dwie otwarte ramy odczytu (ORF – ang. Open Reading Frame) ORF1a i ORF1b kodujące poliproteiny pp1a i pp1ab rozcinane na 16 lub rzadziej na 15 białek niestrukturalnych tworzących kompleks replikacyjno-transkrypcyjny (RTC). Otwarte ramy odczytu od 3' końca kodują białka strukturalne i regulatorowe: białko kolca (S), ORF3A, białko osłonki (E), białko błonowe (M), ORF5, ORF6, ORF7A, ORF7B, ORF8 i białko nukleokapsydu (N). Dolny panel przedstawia procesowanie proteolityczne poliprotein pp1a i pp1ab. Liczby przy segmentach poliprotein odpowiadają numerowi białka niestrukturalnego; funkcja poszczególnych białek opisana jest w Tabeli I.

pozwoliło na wyodrębnienie w niej czterech rodzajów: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* i *Deltacoronavirus*. Wszystkie trzy koronawirusy atakujące dolne drogi oddechowe i wywołujące ciężki przebieg choroby (SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2) oraz wirusy HCoV-OC43 i HCoV-HKU1 należą do rodzaju *Betacoronavirus*, podczas gdy wirusy HCoV-229E i HCoV-NL63 zaliczone zostały do rodzaju *Alphacoronavirus* [46].

3.2. Morfologia

Koronawirusy są wirusami osłonkowymi, których genom stanowi niesegmentowany jednoniciowy RNA o dodatniej polarności liczący od 26 do 32 tysięcy nukleotydów [11, 35]. W 5'-końcowej części genomu wyróżnić można dwie zachodzące na siebie otwarte ramy odczytu (ORF – open reading frame) ORF1a i ORF1b kodujące 15 lub 16 białek niestrukturalnych, natomiast w części 3'-końcowej znajdują się geny kodujące białka strukturalne: białko nukleokapsydu (N – nucleocapside), białko osłonkowe (E – envelope), białko błonowe (M – membrane) oraz glikoproteinę kolca (S – spike), oraz geny kodujące białka regulatorowe (ryc. 1) [24, 77]. Genomowy RNA oraz fosforylowane białko N tworzą helikalny nukleokapsyd otoczony dwuwarstwą fosfolipidową. W osłonce zakotwiczone są dwa rodzaje glikoprotein tworzących tzw. kolce: homotrimer glikoproteiny S występujący u wszystkich koronawirusów oraz hemaglutynina-esteraza obecna tylko u niektórych beta-CoV. Podczas procesu replikacji glikoproteina S rozcinana jest przez proteazę komórkową na dwa peptydy, S1 odpowiedzialny za wiązanie receptora komórkowego i S2 formujący trzon cząsteczki [1]. Pozostałe dwa białka strukturalne, czyli białko błonowe (M) i osłonkowe (E) odpowiedzialne są za składanie potomnych cząstek wirusa i wirulencję i są związane z dwuwarstwą fosfolipidową [2, 24, 61, 68, 70].

3.3. Białko S

Szczególną uwagę zwrócić należy na białko S, pełni ono bowiem kluczową rolę w cyklu replikacyjnym koronawirusów, wiąże się z receptorem na powierzchni komórki docelowej warunkując tropizm wirusa oraz uczestniczy w procesie fuzji pomiędzy osłonką wirusa i błoną komórkową lub endosomu. W N-końcowej części białka S znajduje się sekwencja sygnałowa kierująca białko do retikulum endoplazmatycznego. Dalsza część białka S dzielona jest na N-końcową podjednostkę S1 zawierającą domenę wiążącą receptor (RBD – receptor binding domain) oraz podjednostkę S2, w obrębie której wyróżnić można peptyd odpowiedzialny za fuzję (FP – fusion peptide), wewnętrzny peptyd odpowiedzialny za fuzję (IFP – internal fusion peptide), motywy powtórzeń siedmioaminokwasowych 1/2 (HP1/2 – heptad repeat 1/2) oraz domenę śródbłonową

(TM – transmembrane domain) [36]. W obrębie białka S znajdują się dwa miejsca cięcia proteolitycznego, cięcie w obrębie pierwszego miejsca zlokalizowanego pomiędzy podjednostkami S1 i S2 (miejsce S1/S2) określane jest „priming", natomiast drugie, znajdujące się w N-końcowej części domeny FP (miejsce S2'), rozcinane jest w procesie określonym jako „triggering". „Priming" pozwala cząsteczce S na przyjęcie konformacji umożliwiającej domenie RBD na związanie się z receptorem, natomiast „triggering" pomaga obniżyć barierę energetyczną fuzji z błoną komórkową lub endosomu. W proteolizie białka S uczestniczyć może kilka enzymów komórkowych. Białko S może podlegać działaniu zależnej od pH proteazy cysteinowej katepsyny L, transmembranowej proteazy serynowej 2 (TMPRSS2 – transmembrane serine protease 2) oraz innej proteazy serynowej – furyny. Enzymy te w komórce występują w różnej lokalizacji determinując miejsce fuzji osłonki wirusa z błoną komórki. TMPRSS2 jest zlokalizowana na powierzchni komórki i pozwala na fuzję osłonki z błoną komórkową, podczas gdy katepsyna L występuje w endosomach i rozcina białko S dopiero po tym, jak cząstka wirusowa znajdzie się w pęcherzyku, co pozwala na fuzję pomiędzy osłonką a błoną endosomu [5, 38]. Przebieg kaskady cięć proteolitycznych białka S koronawirusów warunkuje ich tropizm. Dla przykładu wydajne rozcinanie S1/S2 MERS-CoV odbywa się wkrótce po uformowaniu potomnych cząstek wirusa jeszcze w komórkach, w których zachodzi replikacja, co pozwala na równie wydajne cięcie S2' natychmiast po związaniu wirusa z komórką docelową i umożliwia fuzję osłonki z błoną komórkową. Jednak niektóre warianty MERS-CoV oraz inne koronawirusy, procesy proteolityczne białka S rozpoczynają dopiero na powierzchni komórki, co opóźnia przeprowadzenie drugiego cięcia do etapu endosomalnego, a tym samym pozwala na fuzję osłonki z błoną endosomu. Znajomość procesów proteolitycznych umożliwiających zakażenie komórki docelowej pozwala przewidywać tropizm wirusa, patogenezę zakażeń oraz opracować strategię postępowania terapeutycznego [72].

Białko S SARS-CoV-2 ze względu na to, że zawiera epitopy immunodominujące i jest celem przeciwko któremu skierowane są przeciwciała neutralizujące zostało wybrane do skonstruowania szczepionki. W opracowaniu szczepionek mających stymulować odpowiedź immunologiczną przeciwko białku S wykorzystywane są różne strategie, między innymi syntetyczne lub rekombinowane polipeptydy (szczepionki podjednostkowe), wektory wirusowe, mRNA, DNA, wirusy atenuowane [50, 54]. Ostatnio Samad i wsp. zastosowali metody immunoinformatyczne do wybrania epitopów białka S SARS-CoV-2 silnie wiążących się z receptorem TLR4 (toll-like receptor 4) i wywołujących silną odpowiedź immunologiczną na infekcję tym wirusem [76].

3.4. Replikacja

Cykl replikacyjny koronawirusów inicjowany jest przez związanie białka S wirusa z receptorem na powierzchni komórki docelowej. Interakcja białka S z receptorem staje się możliwa po jego rozcięciu na podjednostki S1 i S2 pozostające w połączniu niekowalencyjnym. Następnie białko S podlega prowadzonemu przez proteazy komórkowe cięciu w położonym bezpośrednio przed domeną odpowiedzialną za fuzję miejscu S2'. Cięcie to powoduje zmiany konformacji białka umożliwiające przeprowadzenie fuzji osłonki wirusa z błoną komórki lub endosomu gospodarza, co w konsekwencji umożliwia uwolnienie genomu wirusa do cytoplazmy. Kolejnym etapem replikacji koronawirusa jest translacja otwartych ram odczytu ORF1a i ORF1b doprowadzająca do powstania poliprotein pp1a i pp1ab, które ulegają rozcięciu na 16 lub, rzadziej, 15 białek niestrukturalnych (tab. I, ryc. 1) [69, 71, 80, 102] tworzących kompleks replikacyjno-transkrypcyjny (RTC – replication-transcription complex) [24, 87]. Powstały kompleks odpowiedzialny jest za replikację RNA oraz transkrypcję subgenomowych RNA służących jako matryca do syntezy białek strukturalnych S, E i M wbudowywanych do retikulum endoplazmatycznego oraz białka N tworzącego wraz z RNA nukleokapsyd. Uformowany nukleokapsyd trafia do przedziału ERGIC (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment), gdzie oddziałuje z białkiem M i uzyskuje osłonkę. Interakcje te rozpoczynają proces dojrzewania, transport w pęcherzykach i ostatecznie uwolnienie potomnych wirionów poprzez egzocytozę [19, 24, 64].

4. Jak koronawirusy pokonują barierę międzygatunkową?

Kluczowym etapem cyklu replikacyjnego koronawirusów jest rozpoznanie swoistego receptora na powierzchni komórki. Efektywne połączenie domeny wiążącej receptor białka S koronawirusa z receptorem komórkowym warunkuje wydajną replikację, a także tropizm i zakres zasięgu gatunkowego. Koronawirusy zakażające ludzi pochodzą od wirusów występujących u dziko żyjących zwierząt, głównie nietoperzy i gryzoni, a na człowieka przeniosły się przez organizmy gospodarzy pośrednich, takich jak łaskuny palmowe, jenoty czy wielbłądy jednogarbne. Pokonanie bariery międzygatunkowej przez wirusa zależy od nabycia zdolności wejścia do komórki gospodarza dzięki związaniu ze swoistym receptorem i fuzji pomiędzy osłonką wirusa i błoną komórki. Głównymi receptorami komórkowymi wykorzystywanymi przez koronawirusy człowieka są: aminopeptydaza N (APN – aminopeptidase N) rozpoznawana przez HCoV-229E, konwertaza angiotensyny typ 2 (ACE2

Tabela I
Funkcja białek koronawirusów

	Białko	Funkcja
Białka strukturalne	S	Białko kolca koronawirusów odpowiedzialne za wiązanie z receptorem komórkowym i fuzję z błoną komórkową
	E	Białko osłonki odpowiedzialne za składanie i uwalnianie cząstek potomnych
	M	Białko błonowe oddziałujące z innymi białkami wirusa w procesie składania wirionów potomnych
	N	Nukleoproteina zapewniająca ochronę genomu i jego inkorporację do wirionów potomnych; białko N wiąże się z nsp3 umożliwiając uformowanie kompleksu replikacyjno-transkrypcyjnego
Białka niestrukturalne	nsp1	Hamowanie ścieżki sygnałowej IFN-β; hamowanie translacji poprzez wiązanie i inaktywację podjednostki 40S rybosomów oraz aktywacja komórkowych endonukleaz do cięcia mRNA komórkowego
	nsp2	Wiąże się z prohibityną 1 i 2 przez co zaburza funkcjonowanie ścieżek sygnałowych w komórce
	nsp3	Proteinaza z rodziny papain; uwalnia nsp1, nsp2 i nsp3 z poliproteiny
	nsp4	Oddziałuje z nsp3; uczestniczy w przemodelowaniu błony komórkowej umożliwiającym formowanie kompleksu replikacyjno-transkrypcyjnego
	nsp5	Proteinaza podobna do 3C; zapewnia rozcinanie poliproteiny wirusowej uwalniając przynajmniej 11 białek niestrukturalnych; działa jako supresor wrodzonej odpowiedzi immunologicznej
	nsp6	Zapewnia powstawanie autofagosomów z retikulum endoplazmatycznego; zapobiega dostarczaniu przez autofagosomy elementów wirusowych do degradacji w lizosomach
	nsp7	Wraz z nsp8 działa jako kofaktor dla RNA-zależnej polimerazy RNA (nsp12)
	nsp8	Wraz z nsp7 działa jako kofaktor dla RNA-zależnej polimerazy RNA (nsp12)
	nsp9	Białko wiążące ssRNA; oddziałuje z zawierającą motyw DEAD helikazą RNA 5
	nsp10	Stymuluje aktywność nsp14 i nsp16
	nsp11	Funkcja nieznana
	nsp12	RNA-zależna polimeraza RNA zapewniające zarówno replikację jak i transkrypcję
	nsp13	Helikaza dsRNA; 5'-trójfosfataza; uczestniczy w tworzeniu czapeczki na 5' końcu wirusowego mRNA
	nsp14	3'-5'-egzorybonukleaza zapewniająca poprawność procesu replikacji; metylotransferaza N7-guaninowa uczestniczy w tworzeniu czapeczki na 3' końcu wirusowego mRNA
	nsp15	Endorybonukleaza rozcinająca RNA w pozycji 3' urydyny tworząc 2'-3' cykliczny fosfodiester; degraduje wirusowy dsRNA zapobiegając rozpoznaniu przez organizm gospodarza
	nsp16	2'-O-ribozylo-metylotransferaza metyluje grupę 2'-hydroksylową adeniny w czasie tworzenia czapeczki w wirusowym mRNA

– angiotensin-converting enzyme 2) używana przez wirusy SARS-CoV, SARS-CoV-2 i HCoV-NL63, oraz peptydaza dwupeptydylowa IV (DPP4 – dipeptidyl-peptidase IV) swoista dla MERS-CoV [20, 39, 61].

Nawet niewielka zmiana w obrębie RBD białka S może zmieniać jego powinowactwo do receptora. Yang i wsp. wykazali, że w wyniku dwu mutacji punktowych, S746R and N762A, w białku S wirusa nietoperzy HKU4 spokrewnionego z posiadającym obie te zmiany MERS-CoV nabywa on zdolności do rozpoznawania receptora na komórkach człowieka. Zmutowane białko S HKU4, w odróżnieniu od białka S MERS-CoV, nie podlega jednak aktywacji przez proteazy komórkowe, co uniemożliwia fuzję osłonki z błoną komórki [101]. Podobnie przeniesienie SARS-CoV z łaskuna na człowieka stało się możliwe dzięki wystąpieniu podwójnej substytucji, N479L i T487S w RBD białka S [60]. Inną możliwością zmiany tropizmu koronawirusów jest zajście rzadkiego zjawiska rekombinacji genetycznej powodującej wymianę całego lub części genu kodującego białko S. Przykładem takiego zjawiska jest powstanie kociego koronawirusa (FCoV – feline coronavirus) typu II. Wirus ten pojawił się u kotów w wyniku podwójnej rekombinacji pomiędzy kocim koronawirusem typu I i psim koronawirusem (CCoV – canine coronavirus) typu II, dzięki której FCoV typu I uzyskał gen białka S od CCoV typu II. Skutkiem zmiany jest przekształcenie powodującego łagodne nieżyty jelitowe FCoV typu I w FCoV typu II wywołującego śmiertelne zapalenie otrzewnej [84].

Tropizm i patogeneza koronawirusów zależy również od obecności w białku S sekwencji rozpoznawanych swoiście przez protezy komórkowe, co udowodniono wykazując, że wprowadzenie miejsca rozpoznawanego przez furynę do białka S wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV – infectious bronchitis virus) spowodowało znaczny wzrost jego zjadliwości [12]. Porównanie sekwencji miejsc cięcia w białku S dowiodło, że SARS-CoV-2 posiada miejsce rozpoznawane przez furynę nieobecne u innych koronawirusów tego samego kladu. Nabycie miejsca cięcia przez furynę prawdopodobnie spowodowało uzyskanie przez SARS-CoV-2 zdolności do łatwiejszego rozprzestrzeniania się wśród populacji ludzi w porównaniu do innych betakoronawirusów [16].

Po pokonaniu bariery międzygatunkowej, dzięki wysokiej zmienności mutacyjnej koronawirusów podlegającej selekcji w środowisku organizmu nowego gospodarza dochodzi do powstania wariantów wirusa o wyższej sprawności replikacyjnej i większej oporności na presję ze strony układu immunologicznego. Na początku marca 2020 roku pojawiła się nowa odmiana SARS-CoV-2 z substytucją aminokwasową D614G w białku S. Nowy wariant szybko stał się formą dominującą, co sugerowało, iż zmiana ta wpłynęła korzystnie na transmisję wirusa. Rzeczywiście, detekcja metodą poprzedzonej odwrotną transkrypcją łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym RT-PCR (real time reverse transcription-polymerase chain reaction) pozwoliła stwierdzić wyższe miano nowej odmiany wirusa w obrębie górnych dróg oddechowych. Zaproponowane wyjaśnienie mówi, iż zamiana kwasu asparaginowego na glicynę w pozycji 614 znosi możliwość tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy protomerami białka S, co zwiększa ich elastyczność i ułatwia oddziaływanie pomiędzy protomerami. Ponadto pojawienie się zmiany może zaburzać proces glikozylacji asparaginy w pozycji 616 wpływając na najbliżej położony protomer i jego aktywność pozwalającą na fuzję osłonki [53, 105]. Ostatnie badania wskazują na jeszcze inny mechanizm wpływu mutacji D614G polegający na zwiększeniu gęstości wariantu G614 białka S na powierzchni cząstek wirusa i osłabieniu oddzielania podjednostki S1. Badacze postulują, że połączenie pomiędzy domenami S1 i S2 jest w wariancie D614 słabsze aniżeli w odmianie z substytucją i ta niestabilność może wpływać na zaburzenie struktury błony, właściwy transport, modyfikacje potranslacyjne i wbudowywanie białka S do wirionów potomnych [104].

W listopadzie 2020 roku wykryto w Anglii w próbkach pochodzących z września wariant wirusa oznaczony B.1.1.7 posiadający wiele mutacji mających znaczenie zarówno dla sprawności replikacyjnej wirusa jak i odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Wariant ten szybko rozprzestrzenił się w Wielkiej Brytanii i przedostał się do innych krajów Europy. Najistotniejszą mutacją nowej odmiany wirusa wydaje się być substytucja N501Y leżąca w obrębie RBD i zwiększająca powinowactwo białka S do receptora ACE2. Podwójna delecja 69/70del może natomiast być istotna dla unikania odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy zmiana P681H leży w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca rozpoznawanego przez furynę i może w związku z tym wpływać na wydajność cięcia przez ten enzym [28, 86]. Ustalono, że wariant z mutacją 501Y, ale bez delecji 69/70, który pojawił się na początku września był o około 10% bardziej zakaźny w porównaniu do wariantu 501N, natomiast zakaźność odmiany wirusa 501Y zawierającej delecję 69/70 (wariant B.1.1.7), szerzącej się od końca września wzrosła o około 75% w stosunku do wariantu 501N [58].

5. Receptory komórkowe dla koronawirusów

Patogeneza zakażeń koronawirusami jest, przynajmniej częściowo uwarunkowana lokalizacją receptorów wykorzystywanych przez te wirusy do wniknięcia do komórki. Spośród koronawirusów zakażających człowieka HCoV-229E wykorzystuje do tego celu receptor APN, HCoV-NL63, SARS-CoV i SARS-CoV-2 wiążą się z ACE2, natomiast MERS-CoV rozpoznaje DPP4. Uważa się, że zarówno struktura, jak i poziom ekspresji receptorów komórkowych są kluczowymi czynnikami organizmu gospodarza decydującymi o patogenezie i transmisji koronawirusów [20, 39].

5.1. Peptydaza dwupeptydylowa IV

Peptydaza dwupeptydylowa IV (DPP4 – dipeptidyl peptidase IV), inaczej CD26, została rozpoznana jako receptor dla MERS-CoV w 2013 roku przez Raj i wsp., którzy wyizolowali z lizatów zakażonych komórek Huh-7 DPP4 związany z RBD białka S MERS-CoV [75]. DPP4 jest białkiem transbłonowym typu II występującym w formie dimerów. Część zewnątrzkomórkowa każdego monomeru złożona jest z dwu domen, położonej bliższej błony domeny katalitycznej α/β oraz dalszej ośmioczłonowej domeny wiążącej β o konformacji przypominającej śmigło. Dzięki aktywności hydrolazy domeny α/β DPP4 odcina dipeptydy X-L-prolina lub X-L-alanina z N-końca różnych polipeptydów takich jak hormony, cytokiny, chemokiny, neuropetydy i peptydy wazoaktywne. Człon 4 i 5 struktury β-śmigła DPP4 jest rozpoznawany przez domenę rozpoznającą receptor białka S MERS-CoV [4, 67]. W cząsteczce DPP4 zidentyfikowano 11 reszt aminokwasowych kluczowych dla wiązania z RBD i wykazano, że są one wysoce konserwatywne wśród gatunków wrażliwych na zakażenie MERS-CoV, takich jak wielbłądy, króliki i naczelne, natomiast fretki, szczury, czy myszy niewrażliwe na zakażenie MERS-CoV wykazują znaczne zróżnicowanie w obrębie reszt kluczowych dla wiązania z białkiem S. Tak więc struktura pierwszorzędowa DPP4 wyznacza grupę gatunków zwierząt będących gospodarzami dla MERS-CoV [90, 95].

Transmisja i patogeneza zakażeń MERS-CoV uwarunkowana jest zarówno przez strukturę DPP4 jak i jego tkankową lokalizację oraz poziom ekspresji. Umiejscowienie występowania DPP4 decyduje o znacznie wydajniejszej transmisji MERS-CoV u wielbłądów, aniżeli u ludzi i wyjaśnia, dlaczego głównym źródłem zakażenia MERS-CoV są wielbłądy, podczas gdy transmisja między ludźmi jest znacznie rzadsza. Różnica w poziomie rozprzestrzeniania się wirusa u wielbłądów i u ludzi wynika bowiem z możliwości jego namnażania się w górnych drogach oddechowych u wielbłądów i braku takiej możliwości u ludzi. W wymazach z nosa

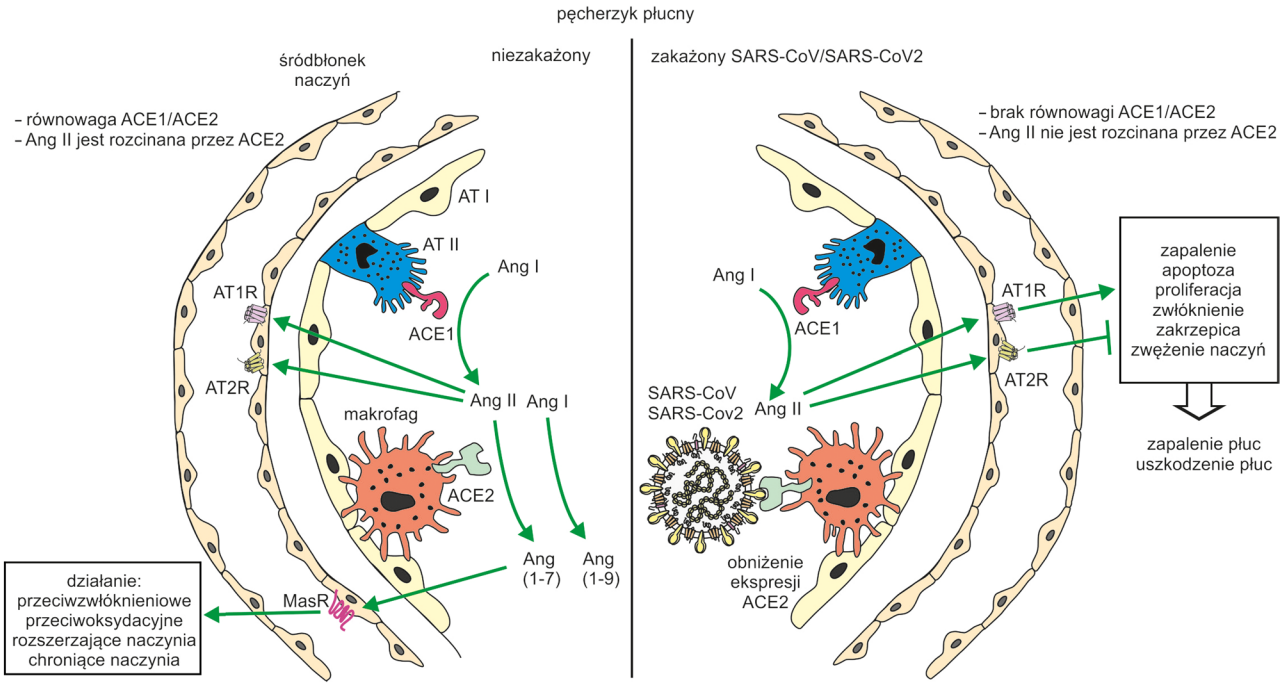
pobranych od wielbłądów, w odróżnieniu od próbek pochodzących od ludzi, wykryto stosunkowo wysoki poziom wirusa. Różnica ta wynika z faktu, że u ludzi receptor DPP4 występuje jedynie nabłonku dolnych dróg oddechowych, głównie w pneumocytach typu II, nieobecny jest natomiast w śluzówce nosa, podczas gdy u wielbłądów DPP4 jest obecny w śluzówce nosa i pozwala wirusowi replikować w tej lokalizacji [94].

Kolejną zagadką rozwiązaną dzięki pracom nad udziałem DPP4 w patogenezie zakażeń MERS-CoV było wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie przebiegu zakażenia tym wirusem. Przebieg kliniczny zakażenia MERS-CoV jest bardzo zróżnicowany, od postaci bezobjawowej aż do ciężkiego zapalenia płuc z zespołem ostrej niewydolności oddechowej, prowadzącym do śmierci [109]. Wskazuje to na istnienie czynników osobniczych decydujących o przebiegu klinicznym zakażenia MERS-CoV. Takimi czynnikami są palenie tytoniu oraz przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD – chronic obstructive pulmonary disease). Wykazano, że palacze oraz pacjenci z COPD są bardziej wrażliwi na zakażenie MERS-CoV, co Seys i wsp. tłumaczą wyższym poziomem ekspresji DPP4 zarówno na etapie mRNA, jak i białka w porównaniu z osobami niepalącymi i nieobarczonymi COPD [78]. 98% powierzchni płuc pokrywają pneumocyty typu I, pozostałą część natomiast pneumocyty typu II. W płucach zdrowych ludzi DPP4 występuje prawie wyłącznie na pneumocytach typu II, podczas gdy u palaczy i pacjentów z COPD dochodzi do ekspresji DPP4 w pneumocytach typu I i białko to występuje w obu tych typach komórek. Obecność receptora na pneumocytach typu I może być przyczyną zakażania i niszczenia tych komórek przez MERS-CoV i prowadzić ostatecznie do rozległego uszkodzenia pęcherzyków płucnych [95].

Poznanie oddziaływań pomiędzy DPP4 i białkiem S MERS-CoV na poziomie molekularnym wykazało, że w bezpośredni kontakt z białkiem S wchodzi 15 aminokwasów [90]. Kleine-Weber i wsp. zadali pytanie, czy naturalnie występujące w DPP4 polimorfizmy dotyczące aminokwasów oddziałujących z białkiem S mogą wpływać na wejście wirusa do komórki. Przeprowadzona analiza wykazała, iż cztery polimorfizmy (K267E, K267N, A291P i Δ346–348) obniżają zdolność wiązania MERS-CoV, a co za tym idzie wydajność zakażania komórek i replikacji wirusa. Tak więc fenotyp DPP4 może oddziaływać na przebieg zakażenia MERS-CoV. Wariant DPP4 z delecją Δ346–348 jest mniej wydajnie, w porównaniu do typu dzikiego białka, transportowany na powierzchnię komórki, natomiast warianty K267E i A291P DPP4 słabiej wiążą się z białkiem S. Podsumowując, naturalnie występujące w DPP4 polimorfizmy mogą utrudniać wnikanie MERS-CoV do komórki i w konsekwencji wpływać na rozwój choroby u zakażonych pacjentów [52].

5.2. Konwertaza angiotensyny typ 2

Konwertaza angiotensyny typ 2 (ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2) jest złożoną z 805 aminokwasów, glikoproteiną transmembranową typu I z zewnątrzkomórkową domeną katalityczną. ACE2 należy do rodziny M2 metaloproteaz, a zlokalizowane po zewnętrznej stronie błony komórkowej domeny katalityczne uczestniczą w przemianach peptydów krążących zewnątrzkomórkowo. ACE2 zlokalizowany jest głównie w sercu, nerkach, jądrach, wątrobie, jelitach i endotelium naczyń krwionośnych, a w mniejszym stopniu w wielu innych organach, głównie w płucach i okrężnicy, nie występuje w komórkach ośrodkowego układu nerwowego [55]. ACE2 jest elementem układu renina-angiotensyna (RAS – renin–angiotensin system), w którym ACE przekształca będącą dekapeptydem angiotensynę I (AngI) w liczącą osiem reszt aminokwasowych angiotensynę II (AngII), natomiast ACE2 ma zdolność odcinania pojedynczych reszt aminokwasowych przekształcając AngI w Ang1-9, a AngII konwertując do Ang1-7. ACE2 w układzie RAS pełni funkcję negatywnego regulatora RAS, działając przeciwnie do ACE w wielu narządach takich jak serce, nerki czy płuca. W układzie oddechowym ACE, AngII i receptor typu 1 AngII (AT1R – AngII receptor type 1) są czynnikami, których działanie prowadzi do uszkodzenia płuc, podczas gdy ACE2 wpływa na płuca ochronnie [44]. Jedną z przyczyn ciężkiego przebiegu zakażenia SARS-CoV i stosunkowo wysokiej śmiertelności może być obniżona ekspresja ACE2 w płucach zakażonych pacjentów wykazana w badaniach Kuba i wsp., którzy dowiedli, że zarówno SARS-CoV, jak i rekombinowane białko S tego wirusa obniża ekspresję ACE2. Tak więc ACE2 w patogenezie zakażeń koronawirusami uczestniczy w dwojaki sposób, po pierwsze umożliwia zakażenie wrażliwych komórek, po drugie pod wpływem zakażenia jego ekspresja ulega osłabieniu, co nieuchronnie prowadzi do uszkodzenia płuc (ryc. 2) [56]. Zjawisko obniżenia poziomu ekspresji ACE2 w komórkach płuc wywołane przez SARS-CoV i HCoV-NL63 oddziałujące z tym receptorem może wyjaśniać różnice w przebiegu zakażenia wywołanego tymi wirusami. Rekombinowane białko S SARS-CoV wiąże się z ACE2 i powoduje jego uwolnienie z powierzchni komórki znacznie wydajniej aniżeli białko S wirusa HCoV-NL63 [31]. Badania strukturalne i biofizyczne wykazały natomiast, że SARS-CoV-2 wiąże się z ACE2 ze znacznie większym powinowactwem niż SARS-CoV. Te różnice w awidności wiązania do ACE2 mogą, przynajmniej częściowo, wyjaśniać łatwość, z jaką SARS-CoV-2 przenosi się między ludźmi [98]. Potwierdzenie tej hipotezy stanowią wyniki badań prowadzonych przez Chu i wsp., którzy odkryli, że SARS-CoV-2 replikuje się w tkankach płuc znacznie wydajniej niż SARS-CoV [15].



Ryc. 2. Rola ACE2 w patogenezie COVID-19

Schemat pęcherzyka płucnego w stanie fizjologicznym (panel lewy) charakteryzujący się równowagą ACE1/ACE2 oraz w czasie infekcji SARS-CoV-2 (panel prawy), gdy ekspresja receptora ACE2 ulega obniżeniu powodując zaburzenie równowagi ACE1/ACE2 i nadaktywację układu renina-angiotensyna (RAS) prowadzącą do uszkodzenia płuc. AT I, AT II – pneumocyty typu I, II; ACE1, ACE2 – enzym typu 1, 2 konwertujący angiotensynę; MasR – receptor Mas; Ang I, II – angiotensyna I, II; AT1R, AT2R – receptor typu 1, 2 angiotensyny II.

Zaburzenie równowagi w układzie RAS poprzez związanie białka S SARS-CoV-2 z ACE2 odgrywa kluczową rolę w patogenezie COVID-19. AngII, która na skutek obniżenia ekspresji ACE2 pozostaje nieprzekształcona do Ang1-7, zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych płuc, co prowadzi do obrzęków płuc, a także stymuluje makrofagi i inne komórki układu odpornościowego do produkcji cytokin prozapalnych, których wzmożona produkcja, tzw. „burza cytokinowa" prowadzi do uszkodzenia płuc oraz niewydolności wielonarządowej kończącej się śmiercią [3, 45, 100].

Badania dotyczące wielu innych wirusów wykazały, że istnienie wariantów allelicznych receptora gospodarza warunkuje wydajność wiązania wirusa, przez co modyfikuje stopień oporności komórki na zakażenie danym wirusem. Dlatego przeprowadzono liczne badania mające określić, czy warianty genetyczne ACE2 mogą determinować przebieg zakażenia SARS-CoV i SARS-CoV-2. Zidentyfikowano niewiele polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w regionach kodujących ACE2 człowieka, ponadto w większości z nich częstość występowania polimorficznego allela wynosi poniżej 5%. Porównanie częstości występowania polimorficznych alleli regionów kodujących i niekodujących ACE2 pomiędzy grupą osób zakażonych SARS-CoV i grupą kontrolną nie potwierdziły istnienia ich związku z wrażliwością na rozwój zakażenia wśród populacji chińskiej i wietnamskiej [14, 48]. Z drugiej strony, utworzone modele polimorficznych wariantów ACE2 obejmujących miejsca zaangażowane w oddziaływania z RBD białka S koronawirusa pozwoliły obserwować wpływ zmian strukturalnych ACE2 na oddziaływania międzycząsteczkowe z białkiem S SARS-CoV-2. W badaniach tych odnotowano, że allele *ACE2* rs73635825 (S19P) i rs143936283 (E329G) wykazują zróżnicowaną zdolność do oddziaływań z wirusowym białkiem S, co wskazuje na wpływ wariantów polimorficznych ACE2 na potencjalną oporność przeciw SARS-CoV-2 [43]. Jednakże rzeczywiste znaczenie tych polimorfizmów trudno ustalić ze względu na ich rzadkie występowanie oszacowane na 3.3×10^{-3} dla rs73635825 w populacji afrykańskiej oraz 6.51×10^{-5} dla rs143936283 w populacji europejskiej [49].

Zhao i wsp. stosując technikę sekwencjonowania RNA pojedynczej komórki wykazali, że głównymi komórkami syntetyzującymi ACE2 są pneumocyty typu II i, co szczególnie interesujące, w komórkach tych wykryto również ekspresję wielu innych białek zapewniających replikację i transmisję wirusa. Innymi komórkami, w których stwierdzono syntezę, choć na niższym poziomie, ACE2 są pneumocyty typu I, fibroblasty, komórki nabłonka oddechowego, komórki śródbłonka oraz makrofagi. Podwójna rola jaką pełni ACE2, który z jednej strony działa ochronne w osi ACE2 – Ang1–7 – receptor Mas, a z drugiej strony stanowi kluczowy czynnik dla wejścia wirusa do komórek, sprawia, że

zarówno wzrost, jak i obniżenie poziomu jego ekspresji w układzie oddechowym może wpływać na rozwój zakażenia i nasilenie przebiegu choroby. Co ciekawe, mimo tego że *loci* genu kodującego ACE2 znajduje się na chromosomie X, u mężczyzn stwierdzono wyższy poziom i szerszą dystrybucję ekspresji ACE2 w porównaniu do kobiet, czym badacze wyjaśniali większy odsetek zakażeń SARS-CoV-2 u mężczyzn [107]. Badania przeprowadzone na większą skalę nie wykazały jednak istotnych różnic w poziomie ekspresji ACE2 w płucach pomiędzy grupami różniącymi się wiekiem (>60 vs <60 r.ż.), płcią i pochodzeniem etnicznym (rasa kaukaska i azjatycka) [7]. Do innych wniosków prowadzą wyniki badań Xie i wsp., którzy ustalili, że poziom ekspresji ACE2 w płucach szczurów zmniejsza się wraz z ich wiekiem i spadek ten jest znaczniejszy u samców, co w połączeniu z działaniem SARS-CoV-2 zmniejszającym ekspresję tego receptora może tłumaczyć wynikający z niedostatku czynnika ochronnego cięższy przebieg zakażenia u osób starszych [99]. Bardziej wrażliwi na rozwój zakażenia SARS-CoV-2 mogą być również palacze, jako że w ich płucach ekspresja ACE2 jest bardziej nasilona, aniżeli u osób niepalących [6, 7]. Rzeczywiście, w płucach ludzi i gryzoni zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji ACE2 w stopniu skorelowanym z liczbą wypalanych papierosów. Ekspresję ACE2 wykazano ponadto w różnych typach komórek wyścielających drogi oddechowe, między innymi w komórkach kubkowych, oskrzelikowych komórkach egzokrynnych i pneumocytach typu II. Długotrwała ekspozycja na dym papierosowy wyzwala reakcję ochronną polegającą na ekspansji wydzielających śluz komórek kubkowych i wzroście ekspresji ACE2 [79]. Fu i wsp., którzy wykryli wysoki poziom ACE2 w jądrach, układzie sercowo-naczyniowym oraz układzie pokarmowym, dostrzegli jeszcze jeden aspekt swoistej dla narządów dystrybucji ekspresji tego białka. Sugerują oni, że SARS-CoV-2 może nie tylko atakować płuca, ale także inne narządy, szczególnie jądra, co może prowadzić do ich uszkodzenia i zaburzenia rozwoju płciowego chłopców i bezpłodności dorosłych [27].

6. Procesowanie proteolityczne białka S

Kluczowym dla tropizmu komórkowego, narządowego, czy gatunkowego jest, poza rozpoznaniem receptora na powierzchni komórki docelowej, proteolityczne procesowanie białka S prowadzące do fuzji osłonki wirusa z błoną komórkową/endosomu. Jak wspomniano w części Charakterystyka koronawirusów, białko S składa się z dwóch funkcjonalnych podjednostek: S1 odpowiedzialnej za wiązanie z receptorem komórkowym oraz S2 zapewniającej fuzję błon wirusa i komórki umożliwiającej wniknięcie cząstki wirusa do cytoplazmy. Białko S zawiera dwa miejsca cięcia. Pierwsze zlokalizowane jest pomiędzy podjednostkami S1 i S2 (miejsce S1/S2), natomiast drugie poprzedza pierwszy peptyd fuzyjny (miejsce S2') w podjednostce S2. Tak więc wyposażenie komórki w swoiście działające proteazy warunkuje tropizm koronawirusów [42]. W proteolizie białka S SARS-CoV i SARS-CoV-2 uczestniczy proteaza TMPRSS2, a jej inhibitory blokują wejście tych wirusów do komórki [39].

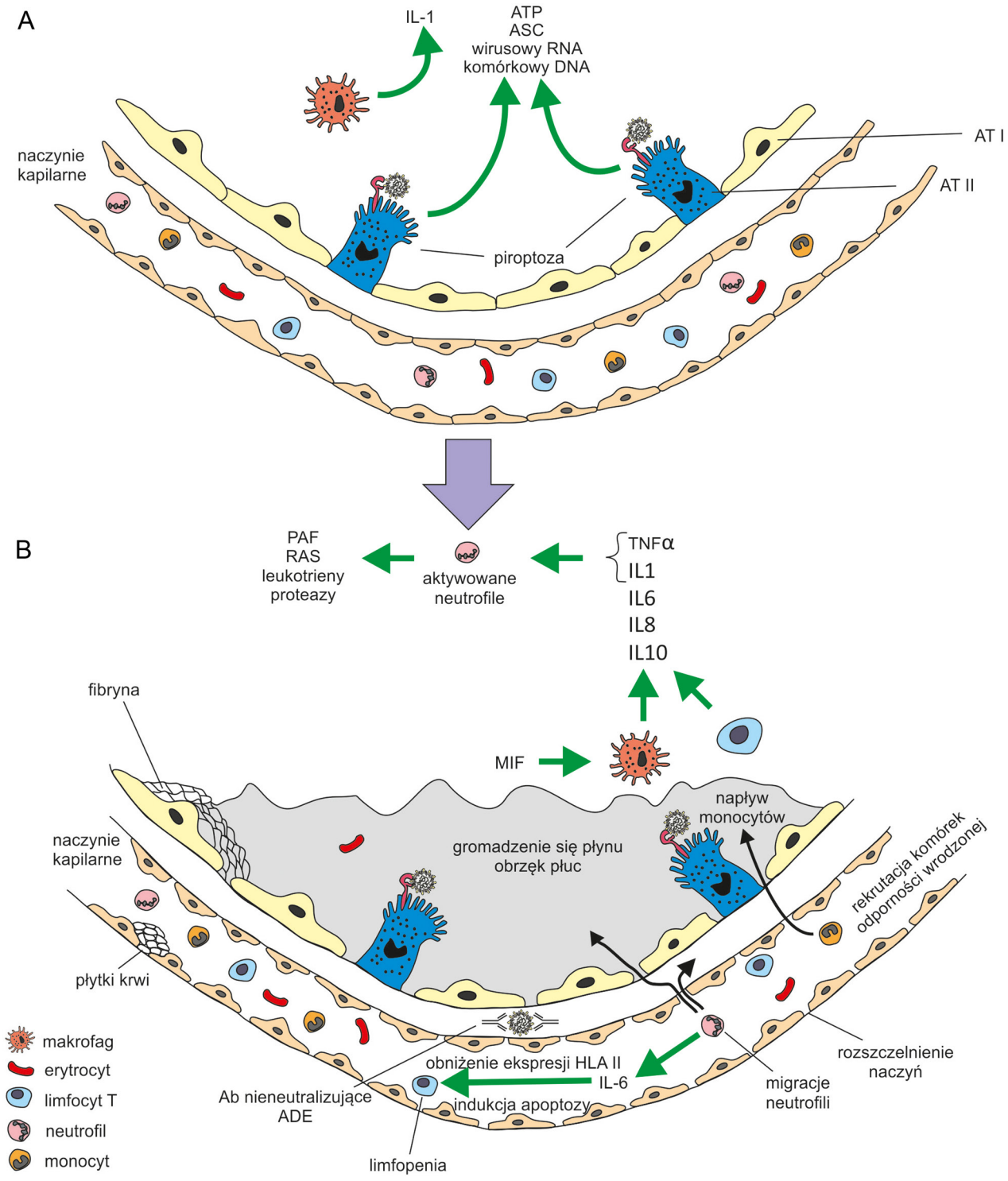
Badania immunohistochemiczne pozwoliły wykryć ekspresję TMPRSS2 przede wszystkim na nabłonku oskrzeli, a także na pneumocytach typu II i makrofagach płucnych, nie ujawniły natomiast obecności tej proteazy na pneumocytach typu I [32, 81]. Ciekawe spostrzeżenie dotyczy obecności polimorfizmu pojedynczego nukleotydu związanej z wyższym poziomem ekspresji TMPRSS2 i przez to zwiększającej wrażliwość pacjentów na rozwój zakażenia wirusem grypy typu A. TMPRSS2 jest bowiem kluczowym czynnikiem aktywującym hemaglutyninę tego wirusa wymaganą do fuzji jego osłonki z błona komórkową [13]. Poziom ekspresji TMPRSS2 jest regulowany przez androgeny, co może być związane z różnicami w ciężkości przebiegu zakażenia wirusami zależnymi od tej proteazy obserwowanymi u kobiet i mężczyzn [81]. Ekspresja TMPRSS2 w pneumocytach typu II jest dodatnio skorelowana z obecnością androgenów i receptorów androgenów w tych komórkach i może wyjaśniać związane z płcią różnice w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 [88].

7. Mechanizmy immunopatogenezy indukowanej zakażeniem SARS-CoV-2

Znaczna część pacjentów z COVID-19 we wczesnym etapie zakażenia wykazuje objawy o niewielkim lub średnim nasileniu, natomiast w późniejszym etapie u części chorych może wystąpić gwałtowny rozwój choroby z zespołem ostrej niewydolności oddechowej i niewydolnością wielonarządową. Poznanie zmian patologicznych w płucach prowadzących do śmierci oraz wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń w działaniu układu odpornościowego chorych z COVID-19 jest istotny dla opracowania skutecznych strategii terapeutycznych. Proponuje się 4 potencjalne mechanizmy wywołanych przez SARS-CoV-2 zmian w funkcjonowaniu układu immunologicznego (ryc. 3).

7.1. Burza cytokinowa

Rozpoznanie zakażenia przez układ odporności wrodzonej prowadzi do wydzielania kluczowych czynników, jakimi są interferony typu I/III. SARS-CoV-2 angażuje receptory rozpoznające wzorce (PRR – pattern recognition receptors) należące do dwóch rodzin:



Ryc. 3. Schemat zjawisk immunopatologicznych w pęcherzyku płucnym podczas zakażenia SARS-CoV-2

Zakażone pneumocyty są źródłem wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem komórek takich jak ATP, ASC – apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domain), wirusowy RNA, komórkowy DNA rozpoznawanych przez komórki nabłonkowe i makrofagi płucne wydzielające cytokiny prozapalne i chemokiny odpowiedzialne za rekrutację monocytów, makrofagów i limfocytów T w miejsce infekcji, co prowadzi do dalszego rozwoju reakcji zapalnej. Nadprodukcja i nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych prowadzi do akumulacji komórek układu odpornościowego i ostatecznie do zniszczenia tkanki płuc. Dodatkowo przeciwciała nieneutralizujące mogą przyczyniać się do procesu wzmacniania zależnego od przeciwciał (ADE) prowadzącego do nasilenia uszkodzenia płuc.

receptory RIG-I-podobne (RLR – RIG-I-like receptors) oraz receptory Toll-podobne (TLR – toll-like receptors) rozpoznające dwuniciowy i jednoniciowy RNA wirusów i inicjujące szlaki sygnałowe prowadzące do wydzielenia cytokin prozapalnych (m.in. IFN typu I, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-18). W wyniku uwolnienia cytokin dochodzi do przekazania sygnału do komórek śródbłonka, które umożliwiają przepływ chemokin do krwi i rekruta-

cję komórek efektorowych odporności wrodzonej do miejsca zakażenia. Zaangażowane komórki NK, monocyty i neutrofile oddziałują ze śródbłonkiem, opuszczają krwioobieg i migrują do miejsca zakażenia, gdzie uaktywniane są mechanizmy prowadzące do zabicia zakażonych komórek oraz wytworzenia antygenowo-swoistej odpowiedzi odporności nabytej. Wydzielane w odpowiednim czasie i właściwym miejscu interferony uznawane są za najefektywniej działający czynnik ograniczający zakażenie CoVs [9]. Śródbłonowe białka indukowane przez IFN (IFITM – interferon-inducible transmembrane proteins) mogą zaburzać proces fuzji, w którym uczestniczy białko S [41]. W późniejszej fazie zakażenia IFN typu I może stać się czynnikiem patogennym, np. poprzez zwiększanie ekspresji ACE2 na powierzchni komórek nabłonka oddechowego [108] lub organizację odpowiedzi zapalnej odpowiedzialnej za zmiany patologiczne o podłożu immunologicznym [47]. SARS-CoV-2, podobnie jak inne koronawirusy, wykształcił różne mechanizmy hamowania indukcji i przekazywania sygnału szlaku IFN. Potwierdzeniem tego zjawiska jest występowanie znacznego zaburzenia szlaku IFN u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 przy jednoczesnej aktywności procesów prozapalnych prowadzących do zmian patologicznych (wydzielanie cytokin prozapalnych). SARS-CoV-2 szczególnie wydajnie indukuje wydzielanie IL-6 i IL-8, np. poprzez hamowanie przy udziale nsp10 endogennego represora NF-κB (NKRF – NF-κB-repressing factor) [62].

Gwałtowny wzrost syntezy cytokin jest zjawiskiem udokumentowanym w ciężkim przebiegu COVID-19 [40; 63]. U pacjentów z najcięższym przebiegiem COVID-19 synteza cytokin takich jak IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, G-CSF (granulocyte colony stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów), GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów), IP-10 (IFN-γ-inducible protein 10; białko indukowane przez interferon gamma), MCP1 (monocyte chemotactic protein-1; białko chemotaktyczne dla monocytów), MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1 alpha; białko zapalne makrofagów), IFN-γ, TNF-α osiąga ekstremalnie wysoki poziom, co jest określone jako „burza cytokinowa". U chorych z łagodniejszą formą zakażenia wzrost poziomu wydzielania cytokin przebiega na zdecydowanie niższym poziomie [40].

7.2. Wyniszczenie i zmniejszenie liczebności limfocytów

Do dysfunkcji i redukcji liczby limfocytów doprowadzać może kilka mechanizmów. Wykazano, że SARS-CoV-2 może zakażać limfocyty i makrofagi dzięki ekspresji receptora ACE2 mającej miejsce szczególnie na limfocytach T. Zdolność do zakażania zarówno limfocytów T jak i makrofagów jest kluczowym mechanizmem patogenezy SARS-CoV [73]. Wykazano, że SARS-CoV-2 zakaża limfocyty pomocnicze Th $CD4^+$, ale nie cytotoksyczne Tc $CD8^+$ i jest wykrywany w limfocytach Th we krwi oraz w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych. W procesie wejścia wirusa do Th $CD4^+$ istotną rolę odgrywa oddziaływanie białka S z cząsteczką CD4 oraz wymagany jest udział ACE2 i TMPRSS2. W zakażonych przez SARS-CoV-2 limfocytach wzrasta poziom syntezy IL-10 w stopniu skorelowanym z nasileniem choroby. Zjawisko to może wyjaśniać słabą odpowiedź ze strony układu odporności wrodzonej, gdyż IL-10 jest czynnikiem hamującym ekspresję cytokin prozapalnych [17]. Również Diao i wsp. wnioskują, iż w obniżeniu liczby i osłabieniu aktywności limfocytów Th uczestniczy TNF-α, IL-10 i IL-6 [21]. Ponadto szczególnie ważne wydaje się być oddziaływanie IL-6 poprzez obniżenie ekspresji HLA klasy II na monocytach $CD14^+$ oraz limfocytach B [30, 96]. Spadek liczby cząsteczek HLA u pacjentów z COVID-19 może powodować zaburzenie zdolności do prawidłowej odpowiedzi limfocytów Th ze względu na ograniczenie możliwości prezentacji antygenu poprzez TCR. W takich warunkach limfocyty Th ulegają apoptozie. Masowe niszczenie limfocytów związane z wysokim poziomem ekspresji IL-6 oraz indukcję apoptozy zależnej od Fas odnotowano w czasie autopsji pacjentów z COVID-19 [25]. W badaniach sekcyjnych narządów chorych zmarłych z powodu ciężkiego przebiegu COVID-19 ujawniono bezpośrednie niszczenie narządów limfatycznych, atrofię śledziony i nekrozę węzłów chłonnych, wywoływane przez SARS-CoV-2 prowadzące do limfopenii [8, 59]. Innym jeszcze mechanizmem wyjaśniającym zjawisko limfopenii u chorych z ciężką postacią COVID-19 jest wzrost poziomu kwasu mlekowego we krwi, co może hamować proliferację aktywowanych limfocytów T [83]. Kolejną przyczyną wyczerpania limfocytów T jest ich długotrwała nadmierna aktywacja. W limfocytach Th $CD4^+$ i Tc $CD8^+$ izolowanych z krwi pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 wykryto wzrost poziomu PD-1 (programmed cell death protein 1), TIM-3 (mucin domain- containing protein 3) i ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), markerów świadczących o ich wyczerpaniu, przy równocześnie obniżonym poziomie ekspresji stymulatora CD28 [18].

7.3. Wzrost liczebności neutrofili

U pacjentów z COVID-19 stwierdza się podwyższony poziom neutrofili [74]. Neutrofile indukowane są przez pojawienie się drobnoustrojów i mogą prowadzić do ich zniszczenia poprzez tworzenie aktywnych form tlenu, degranulację, wydzielanie czynników

przeciwdrobnoustrojowych, ale również poprzez formowanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs – neutrophil extracellular traps). Zaburzenie poziomu czynników wydzielanych przez neutrofile może prowadzić do uszkodzenia tkanek, co znalazło potwierdzenie w badaniach, w których w surowicy chorych z ciężkim przebiegiem zakażenia SARS-CoV-2 wykazano podwyższony poziom DNA pozakomórkowego, mieloperoksydazy-DNA (MPO-DNA – myeloperoxidase-DNA), i cytrulinowanych histonów H3 (Cit-H3 – citrullinated histone H3) będących markerami związanymi z NET [110].

7.4. Wzmocnienie zależne od przeciwciał

Zjawisko zależnego od przeciwciał wzmocnienia zakażenia wirusowego (ADE – antibody-dependent enhancement) jest związane z udziałem wcześniej istniejących przeciwciał nieneutralizujących ułatwiających wejście wirusa do komórki i jego replikację. Udział ADE w patogenezie zakażeń wykazano dla SARS-CoV, który poprzez oddziaływanie receptorów FcR z fragmentami Fc przeciwciał związanych z wirusem może zakażać i zmieniać funkcjonowanie makrofagów prowadząc do hiperstymulacji układu odpornościowego i uszkodzenia płuc [65] oraz MERS-CoV, którego białko S po połączeniu z przeciwciałami ulega przekształceniu ułatwiającemu zakażanie komórek posiadających na powierzchni receptor dla Fc [22, 89].

Powstaje pytanie, czy obecność przeciwciał nieneutralizujących może pogarszać przebieg zakażenia SARS-CoV-2. Wiadomo, że w zakażeniu SARS-CoV powstają przeciwciała przeciwko różnym epitopom białka S działające albo ochronnie, albo wzmacniające zakażenie tym wirusem u makaków. Przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi S579-603 silnie pogłębiały uszkodzenie płuc u makaków [91]. U myszy szczepionych czterema różnymi szczepionkami przeciwko SARS-CoV po zakażeniu odnotowano niższy poziom wirusa w porównaniu do kontroli, ale w odróżnieniu od kontroli w płucach zwierząt poddanych przed zakażeniem szczepieniu wykazano obecność zmian histopatologicznych z naciekaniem eozynofilów [85].

Dotychczas przeprowadzone badania, obejmujące niewielką grupę pacjentów, nie wykazały nasilenia objawów zakażenia SARS-CoV-2 po zastosowaniu osocza ozdrowieńców [23]. Efektu ADE nie odnotowano także po zastosowaniu inaktywowanych szczepów SARS-CoV-2 użytych do szczepienia myszy, szczurów i zwierząt z rzędu naczelnych [29]. Możliwość udziału przeciwciał w patogenezie COVID-19 pozostaje jednak tematem zasługującym na zwrócenie szczególnej uwagi ze względu na trzy zjawiska obserwowane w przebiegu pandemii SARS-CoV-2. Po pierwsze, występujący najczęściej bezobjawowy przebieg zakażenia u dzieci, co może być związane z brakiem wcześniejszego kontaktu z koronawirusami i brakiem przeciwciał mogących krzyżowo reagować z SARS-CoV-2. Po drugie, wczesne pojawianie się przeciwciał IgG u części pacjentów, u których serokonwersja IgG występowała przed IgM lub jednocześnie z IgM. Po trzecie dodatnia korelacja między wysokim poziomem przeciwciał, a niezależnym od wieku, płci i występowania innych schorzeń złym rokowaniem przebiegu choroby. Wyjaśnieniem tych obserwacji może być obecność przeciwciał powstałych po wcześniejszym kontakcie z koronawirusami powodującymi przeziębienia i wywołującymi zależne od przeciwciał wzmocnienie przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 [66, 106].

8. Podsumowanie

Po raz trzeci w ciągu XXI wieku koronawirusy pokonały barierę międzygatunkową atakując człowieka. Pandemia ta spowodowała paraliż nie tylko systemu opieki zdrowotnej, ale wielu innych dziedzin na całym świecie. Konieczne jest szczegółowe poznanie mechanizmów cyklu replikacyjnego koronawirusów oraz ich interakcji z białkami gospodarza, co może pozwolić na opracowanie skutecznych działań terapeutycznych i prewencyjnych w stosunku do tych do niedawna uważanych za stosunkowo nieszkodliwe wirusów. Z drugiej strony, równie ważne jest poznanie czynników osobniczych uczestniczących w replikacji koronawirusów oraz pojawiających się w odpowiedzi na zakażenie, gdyż nawet niewielkie zmiany jakościowe lub ilościowe związane ze zmianą poziomu ich ekspresji mogą okazać się kluczowe dla przebiegu choroby.

Podziękowania

Podziękowania dla dr. n. med. Piotra Kruszyńskiego za pomoc w przygotowaniu rycin.

Praca została sfinansowana ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach przyznanych w ramach projektu o numerze KNW-1-058/N/9/I.

Piśmiennictwo

1. Belouzard S., Chu V.C., Whittaker G.R.: Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5871–5876 (2009)
2. Beniac D.R., Andonov A., Grudeski E., Booth T.F.: Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 751-752 (2006)
3. Bernstein K.E., Khan Z., Giani J.F., Cao D.Y., Bernstein E.A., Shen X.Z.: Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 325–336 (2018)
4. Boonacker E., Van Noorden C.J.: The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 53–73 (2003)

5. Burkard C., Verheije M.H., Wicht O., van Kasteren S.I., van Kuppeveld F.J., Haagmans B.L., Pelkmans L., Rottier P.J., Bosch B.J., de Haan C.A.: Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog.* **10**, e1004502(2014)
6. Cai G., Bossé Y., Xiao F., Kheradmand F., Amos CI.: Tobacco Smoking Increases the Lung Gene Expression of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **201**, 1557–1559 (2020)
7. Cai G.: Bulk and single-cell transcriptomics identify tobacco-use disparity in lung gene expression of ACE2, the receptor of 2019-nCov. *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.02.05.20020107 (2020)
8. Cao X.: COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 269–270 (2020)
9. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., Sompallae R., McCray P.B. Jr, Meyerholz D.K., Perlman S.: IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.* **129**, 3625–3639 (2019)
10. Chen N., Zhang L. i wsp.: Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, **395**, 507–513 (2020)
11. Chen Y., Liu Q., Guo D.: Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**, 418–423 (2020)
12. Cheng J., Zhao Y., Xu G., Zhang K., Jia W., Sun Y., Zhao J., Xue J., Hu Y., Zhang G.: The S2 Subunit of QX-type Infectious Bronchitis Coronavirus Spike Protein Is an Essential Determinant of Neurotropism. *Viruses*, **11**, 972 (2019)
13. Cheng Z., Yuen K.Y. i wsp.: Identification of TMPRSS2 as a susceptibility gene for severe 2009 pandemic A(H1N1) influenza and A(H7N9) influenza. *J. Infect. Dis.* **212**, 1214–1221 (2015)
14. Chiu R.W., Lo Y.M. i wsp.: ACE2 gene polymorphisms do not affect outcome of severe acute respiratory syndrome. *Clin. Chem.* **50**, 1683–1686 (2004)
15. Chu H., Yuen K.Y. i wsp.: Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 1400–1409 (2020)
16. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E.: The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* **176**, 104742 (2020)
17. Davanzo G.G., Farias A.S. i wsp.: SARS-CoV-2 Uses CD4 to Infect T Helper Lymphocytes. *medRxiv,* DOI: 10.1101/2020.09.25.20200329 (2020)
18. de Candia P., Prattichizzo F., Garavelli S., Matarese G.: T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol.* **42**, 18–30 (2021)
19. de Haan C.A., Rottier P.J.: Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **64**, 165–230 (2005)
20. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J.: Host Factors in Coronavirus Replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **419**, 1–42 (2018)
21. Diao B., Chen Y. i wsp.: Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* **11**, 827 (2020)
22. Du L., Zhou Y. i wsp.: A conformation-dependent neutralizing monoclonal antibody specifically targeting receptor-binding domain in Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* **88**, 704570–704553 (2014)
23. Duan K., Yang X. i wsp.: Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 9490–9496 (2020)
24. Fehr A.R., Perlman S.: Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* **1282**, 1–23 (2015)
25. Feng Z., Chen Y. i wsp.: The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.03.27.20045427 (2020)
26. Forni D., Cagliani R., Clerici M.: Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* **25**, 35–48 (2017)
27. Fu J., Zhou B., Zhang L., Balaji K.S., Wei C., Liu X., Chen H., Peng J., Fu J.: Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 4383–4392 (2020)
28. Galloway S.E., Dugan V.G. i wsp.: Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage – United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **70**, 95–99 (2021)
29. Gao Q., Qin C. i wsp.: Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, **369**, 77–81 (2020)
30. Giamarellos-Bourboulis E.J., Koutsoukou A. i wsp.: Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*, **27**, 992–1000 (2020)
31. Glowacka I., Pöhlmann S. i wsp.: Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J. Virol.* **84**, 1198–1205 (2010)
32. Glowacka I., Pöhlmann S. i wsp.: Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J. Virol.* **85**, 4122–4134 (2011)
33. Gorbalenya A.E., Enjuanes L., Ziebuhr J., Snijder EJ.: Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**, 17–37 (2006)
34. Gralinski L.E., Menachery V.D.: Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, **12**, 135 (2020)
35. Guan W.J., Zhong N.S. i wsp.: China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020)
36. Heald-Sargent T., Gallagher T.: Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*, **4**, 557–580 (2012)
37. Hindson J.: COVID-19: faecal-oral transmission? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 259 (2020)
38. Hoffmann M., Hofmann-Winkler H., Pöhlmann S.: Priming Time: How Cellular Proteases Arm Coronavirus Spike Proteins (w) Activation of Viruses by Host Proteases, red. Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Klenk H.D, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, 2018, s. 71–98
39. Hoffmann M., Pöhlmann S. i wsp.: SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, **181**, 271–280 (2020)
40. Huang C., Cao B. i wsp.: Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, **395**, 497–506 (2020)
41. Huang I.C., Farzan M. i wsp.: Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog.* **7**, e1001258 (2011)
42. Hulswit R.J.G., de Haan C.A.M., Bosch B.-J.: Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv. Virus Res.* **96**, 29–57 (2016)
43. Hussain M., Jabeen N., Raza F., Shabbir S., Baig A.A., Amanullah A., Aziz B.: Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *J. Med. Virol.* **92**, 1580–1586 (2020)
44. Imai Y., Kuba K., Ohto-Nakanishi T., Penninger JM.: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ. J.* **74**, 405–410 (2010)

45. Imai Y., Penninger J.M. i wsp.: Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **436**, 112–116 (2005)
46. International Committee on Taxonomy of Viruses. https://talk.ictvonline.org (17.02.2021)
47. Israelow B., Iwasaki A. i wsp.: Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J. Exp. Med.* **217**, e20201241 (2020)
48. Itoyama S., Sasazuki T. i wsp.: Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphisms of angiotensin--converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. *Am. J. Med. Genet. A*, **136**, 52–57 (2005)
49. Karczewski K.J., MacArthur D.G. i wsp.: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, **581**, 434–443 (2020)
50. Kaur S.P., Gupta V.: COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Res.* **288**, 198114 (2020)
51. Khalaf K., Papp N., Chou J.T., Hana D., Mackiewicz A., Kaczmarek M.: SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment. *Front. Immunol.* **11**, 570927 (2020)
52. Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Prokscha A., Naim H.Y., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S., Hoffmann M.: Polymorphisms in dipeptidyl peptidase 4 reduce host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 155–168 (2020)
53. Korber B., Montefiori D.C. i wsp.: Tracking Changes in SARS--CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, **182**, 812–827 (2020)
54. Krammer F.: SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, **586**, 516–527 (2020)
55. Kuba K., Imai Y., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M.: Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol. Ther.* **128**, 119–128 (2010)
56. Kuba K., Penninger J.M. i wsp.: A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879 (2005)
57. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., Azman A.S., Reich N.G., Lessler J.: The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann. Intern. Med.* **172**, 577–582 (2020)
58. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T.: Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro. Surveill.* **26**, 2002106 (2021)
59. Li D., Chen Y., Liu H., Jia Y., Li F., Wang W., Wu J., Wan Z., Cao Y., Zeng R.: Immune dysfunction leads to mortality and organ injury in patients with COVID-19 in China: insights from ERS--COVID-19 study. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 62 (2020)
60. Li F.: Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *J. Virol.* **82**, 6984–6991 (2008)
61. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J.: Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* **92**, 424–432 (2020)
62. Li J., Liang Q. i wsp.: Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS--CoV-2 Pathogenesis. *Med.* **2**, 99–112 (2021)
63. Li X., Zhang W. i wsp.: Immune characteristics distinguish patients with severe disease associated with SARS-CoV-2. *Immunol Res.* **68**, 398–404 (2020)
64. Lim Y.X., Ng Y.L., Tam J.P., Liu D.X.: Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*, **4**, 26 (2016)
65. Liu L., Chen Z. i wsp.: Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS--CoV infection. *JCI Insight*, **4**, e123158 (2019)
66. Long Q.X., Huang A.L. i wsp.: Antibody responses to SARS--CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 845–848 (2020)
67. Lu G., Gao G.F. i wsp.: Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, **500**, 227–231 (2013)
68. Nal B.: Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J. Gen. Virol.* **86**, 1423-1434 (2005)
69. Narayanan K., Ramirez S.I., Lokugamage K.G., Makino S.: Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res.* **202**, 89–100 (2015)
70. Neuman B.W., Buchmeier M.J. i wsp.: A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.* **174**, 11-22 (2011)
71. Neuman B.W., Buchmeier M.J.: Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv. Virus Res.* **96**, 1–27 (2016)
72. Park J.E., Li K., Barlan A., Fehr A.R., Perlman S., McCray P.B. Jr, Gallagher T.: Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12262–12267 (2016)
73. Perlman S., Dandekar A.A.: Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 917–927 (2005)
74. Qin C., Tian D.S. i wsp.: Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 62–768 (2020)
75. Raj V.S., Haagmans B.L. i wsp.: Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, **495**, 251–254 (2013)
76. Samad A., Ahammad F., Nain Z., Alam R., Imon R.R., Hasan M., Rahman M.S.: Designing a multi-epitope vaccine against SARS--CoV-2: an immunoinformatics approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–17 (2020)
77. Sawicki S.G., Sawicki D.L., Siddell S.G.: A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20–29 (2007)
78. Seys L.J.M., Widagdo W., Verhamme F.M., Kleinjan A., Janssens W., Joos G.F., Bracke K.R., Haagmans B.L., Brusselle G.G.: DPP4, the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor, is Upregulated in Lungs of Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 45–53 (2018)
79. Smith J.C., Sausville E.L., Girish V., Yuan M.L., Vasudevan A., John K.M., Sheltzer J.M.: Cigarette Smoke Exposure and Inflammatory Signaling Increase the Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Respiratory Tract. *Dev. Cell*, **53**, 514–529 (2020)
80. Snijder E.J., Decroly E., Ziebuhr J.: The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv. Virus Res.* **96**, 59–126 (2016)
81. Stopsack K.H., Mucci L.A., Antonarakis E.S., Nelson P.S., Kantoff P.W.: TMPRSS2 and COVID-19: Serendipity or Opportunity for Intervention? *Cancer Discov.* **10**, 779–782 (2020)
82. Su S., Wong G., Shi W.: Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* **24**, 490–502 (2016)
83. Tan L., Wang Q., Zhang D., Ding J., Huang Q., Tang Y.Q., Wang Q., Miao H.: Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 33 (2020)
84. Terada Y., Matsui N., Noguchi K., Kuwata R., Shimoda H., Soma T., Mochizuki M., Maeda K.: Emergence of pathogenic

coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One*, **9**, e106534 (2014)
85. Tseng C.T., Sbrana E., Iwata-Yoshikawa N., Newman P.C., Garron T., Atmar R.L., Peters C.J., Couch R.B.: Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One*, **7**, e35421 (2012)
86. Volz E., Ferguson N.M. i wsp.: Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *medRxiv*, 2020.12.30, 20249034
87. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D.: Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, **181**, 281–292 (2020)
88. Wambier C.G., Goren A., Vaño-Galván S., Ramos P.M., Ossimetha A., Nau G., Herrera S., McCoy J.: Androgen sensitivity gateway to COVID-19 disease severity. *Drug Dev. Res.* **81**, 771–776 (2020)
89. Wan Y., Li F. i wsp.: Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J. Virol.* **94**, e02015–19 (2020)
90. Wang N., Wang X. i wsp.: Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* **23**, 986–993 (2013)
91. Wang Q., Liu G. i wsp.: Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect. Dis.* **2**, 361–376 (2016)
92. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). November, 2019, http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/ (17.02.2021)
93. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Dec 31, 2003, https://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/ (17.02.2021)
94. Widagdo W., Haagmans B. i wsp.: Differential Expression of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor in the Upper Respiratory Tracts of Humans and Dromedary Camels. *J. Virol.* **90**, 4838–4842 (2016)
95. Widagdo W., Sooksawasdi Na Ayudhya S., Hundie G.B., Haagmans B.L.: Host Determinants of MERS-CoV Transmission and Pathogenesis. *Viruses*, **11**, 280 (2019)
96. Wilk A.J., Blish C.A. i wsp.: A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1070–1076 (2020)
97. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update. https://covid19.who.int/ (17.02.2021)
98. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S.: Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science*, **367**, 1260–1263 (2020)
99. Xie X., Chen J., Wang X., Zhang F., Liu Y.: Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. *Life Sci.* **78**, 2166–2171 (2006)
100. Xu Z., Wang F.S. i wsp.: Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* **8**, 420–422 (2020)
101. Yang Y., Liu C., Du L., Jiang S., Shi Z., Baric R.S., Li F.: Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* **89**, 9119–9123 (2015)
102. Yoshimoto F.K.: The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.* **39**, 198–216 (2020)
103. Zhang B., Zhou X., Qiu Y., Song Y., Feng F., Feng J., Song Q., Jia Q., Wang J.: Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. *PLoS One*, **15**, e0235458 (2020)
104. Zhang L., Choe H. i wsp.: SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat. Commun.* **11**, 6013 (2020)
105. Zhang L., Jackson C.B., Mou H., Ojha A., Rangarajan E.S., Izard T., Farzan M., Choe H. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *bioRxiv* [Preprint], 2020.06.12, 148726
106. Zhao J., Zhang Z. i wsp.: Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2027–2034 (2020)
107. Zhao Y., Zhao Z., Wang Y., Zhou Y., Ma Y., Zuo W.: Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **202**, 756–759 (2020)
108. Ziegler C.G.K., Ordovas-Montanes J. i wsp.: SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*, **181**, 1016–1035 (2020)
109. Zumla A., Hui D.S., Perlman S.: Middle East respiratory syndrome. *Lancet*, **3**, 60454–60458 (2015)
110. Zuo Y., Knight J.S. i wsp.: Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight.* **5**, e138999 (2020)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 137–149
DOI: 10.21307/PM-2021.60.2.11

GLIKOZYLACJA BIAŁEK W KOMÓRKACH BAKTERYJNYCH I JEJ POTENCJALNE ZASTOSOWANIA

Agnieszka Wyszyńska*, Rafał Jabłuszewski

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło we wrześniu 2020 r., zaakceptowano w styczniu 2021 r.

Streszczenie: Glikokoniugaty bakteryjne są szeroko rozpowszechnione i mają różnorodne funkcje biologiczne. Przykładem są glikoproteiny, które uczestniczą w adhezji, inwazji czy unikaniu mechanizmów obronnych gospodarza. Systemy umożliwiające tę modyfikację są od niedawna obiektem intensywnych badań naukowych. Ich aktywność opiera się na działaniu glikozylotransferaz – enzymów, które przenoszą reszty cukrowe bezpośrednio na białko akceptorowe (glikozylacja sekwencyjna) lub na lipidowy nośnik, z którego glikan na docelowe białko przenosi transferaza oligosacharydowa (glikozylacja *en-bloc*). Wprowadzenie genów odpowiadających za glikozylację białek do komórek *E. coli* i uzyskanie funkcjonalnych, rekombinowanych glikoprotein, spowodowało rozwój glikoinżynierii bakteryjnej. Transferazy oligosacharydowe wykazują aktywność wobec szerokiej gamy substratów, co można wykorzystać m.in. do produkcji szczepionek polisacharydowych.

1. Potranslacyjne modyfikacje białek. 2. Glikozylacja – charakterystyka. 3. Glikozylacja białek w komórkach organizmów eukariotycznych. 4. Glikozylacja białek u bakterii. 4.1. O-glikozylacja w komórkach bakteryjnych. 4.2. N-glikozylacja u organizmów prokariotycznych. 5. Praktyczne zastosowania glikozylacji białek – glikoinżynieria. 6. Podsumowanie

PROTEIN GLYCOSYLATION IN BACTERIAL CELLS AND ITS POTENTIAL APPLICATIONS

Abstract: Bacterial glycoconjugates are widespread and have diverse biological functions. Multiple bacterial glycoproteins are involved in adhesion, invasion or evasion of host defense mechanisms. A range of glycosylation pathways has recently been an object of intense research. Their activity is based on the glycosyltransferases – enzymes that transfer sugar moieties directly to the acceptor protein (sequential glycosylation) or to a lipid carrier from which the glycan is transferred by an oligosaccharyltransferase onto the target protein (en-bloc glycosylation). Successful implementation of complete glycosylation systems in *Escherichia coli* cells resulted in rapid development of bacterial glycoengineering. Oligosaccharyltransferases are characterized by a broad substrate specificity which may be exploited to produce glycoconjugate vaccines.

1. Post-translational protein modifications. 2. Characteristics of glycosylation. 3. Protein glycosylation in eukaryotic cells. 4. Protein glycosylation in bacteria. 4.1. O-glycosylation in bacterial cells. 4.2. N-glycosylation in bacterial cells. 5. Practical applications of protein glycosylation – glycoengineering. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, glikoproteiny, glikoinżynieria, glikozylacja
Keywords: *Campylobacter,* glycoproteins, glycosylation, glycoengineering

1. Potranslacyjne modyfikacje białek

Łańcuch nukleotydowy o długości 150 par zasad potencjalnie może kodować 10^{195} różnych białek. Liczba ta wynika jedynie z jego długości [35]. Różnorodność białek istotnie wzrasta na poziomie translacji, co jest efektem m.in. wykorzystania aminokwasów niekanonicznych: selenocysteiny, selenometioniny oraz pirolizyny [116]. Ponadto znaczącą część proteomu tworzą białka, których łańcuch/y boczny/e ulega/ją potranslacyjnym modyfikacjom (PTM; Post-Translational Modification). Z ponad 200 zidentyfikowanych do tej pory chemicznych modyfikacji białek do najczęściej spotykanych należą: fosforylacja, glikozylacja, acylacja, metylacja, acetylacja, oksydacja, hydroksylacja, deaminacja oraz tworzenie wiązania dwusiarczkowego [54]. PTM wpływają na strukturę białek, regulują ich aktywność enzymatyczną i interakcje z innymi molekułami. Wykazano, że około jedna trzecia białek występujących w komórkach ssaków zawiera kowalencyjnie związane fosforany, których poziom jest kontrolowany przez aktywność kinaz i fosfataz białkowych. Fosforylacja umożliwia kontrolę różnych procesów komórkowych, w tym cyklu komórkowego, wzrostu, apoptozy. Jest również istotnym elementem transdukcji sygnałów.

Niniejsza publikacja traktuje o glikozylacji – jednej z najbardziej rozpowszechnionych potranslacyjnych modyfikacji białek. Chociaż jej znaczenie w komórkach organizmów eukariotycznych było, i nadal jest, źródłem intensywnych badań, glikozylacja u prokariotów stosunkowo niedawno zwróciła uwagę społeczności naukowej. Odkrycie glikoprotein u bakterii przyniosły

* Autor korespondencyjny: dr hab. Agnieszka Wyszyńska, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554 13 41; e-mail: agawysz@biol.uw.edu.pl

dopiero lata 70. XX wieku [83]. Różnorodność białek prokariotycznych modyfikowanych przez dołączenie grup cukrowych wskazuje jednak, że glikozylacja w tych organizmach jest raczej normą niż wyjątkiem.

2. Glikozylacja – charakterystyka

Glikozylacja białek polega na enzymatycznym przyłączaniu glikanu do określonych reszt aminokwasowych polipeptydu. Do tej pory opisano cztery jej rodzaje: O-glikozylację, N-glikozylację, S-glikozylację oraz C-mannozylację [10]. Przyłączenie jednostki cukrowej do atomu tlenu grupy hydroksylowej w bocznym łańcuchu seryny (Ser) i/lub treoniny (Thr) ma miejsce w przypadku O-glikozylacji. Dołączenie reszty cukrowej do azotu grupy aminowej asparaginy charakteryzuje natomiast N-glikozylację. Warunkiem koniecznym jest obecność asparaginy (Asn) w obrębie sekwencji konsensusowej Asn-X-Ser/Thr, gdzie X to dowolny aminokwas z wyjątkiem proliny. W przypadku komórek *Campylobacter* wykazano, że w pozycji – 2 od modyfikowanej asparaginy musi dodatkowo występować kwasowy aminokwas, tj. kwas glutaminowy (Glu) lub kwas asparaginowy (Asp) [63]. Opisano również S-glikozylację, w której grupa cukrowa wiąże się z cysteiną, oraz występującą tylko u ssaków C-mannozylację, którą cechuje dołączenie mannozy do atomu węgla C2 grupy indolowej tryptofanu poprzez wiązanie C-C [83, 97]. Jak dotąd S-glikozylowane białka opisano w komórkach m.in. *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* czy *Enterococcus faecalis* [79, 85, 108]. W glikoproteinach zidentyfikowanych w obrębie *Bacteria* i *Archaea* dominuje typ wiązania O-glikozydowego.

Glikoproteiny charakteryzuje ogromna różnorodność, co w dużej mierze wynika z właściwości monosacharydów budujących grupy cukrowe. Mogą one występować w różnych postaciach epimerycznych (glukoza, mannoza i galaktoza), ulegać dodatkowym modyfikacjom polegającym na przyłączeniu grup siarczanowych, acetylowych czy fosforanowych, jak również łączyć się ze sobą na wiele sposobów (zarówno pod względem pozycji, jak i stereochemii wiązania). Olbrzymią różnorodność warunkuje także zdolność cukrów do tworzenia rozgałęzień, a to sprawia, że glikany związane z białkami są unikalne pod względem składu i/lub architektury, zatem idealnie nadają się do przechowywania szerokiego zestawu informacji biologicznych i biorą aktywny udział w komunikacji międzykomórkowej [27].

Ustalenie budowy cukrowego składnika glikoprotein nie jest łatwym zadaniem. Dopiero pojawienie się zaawansowanych technik analitycznych, w tym jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) i wariantów spektrometrii masowej (MS) umożliwiło gwałtowny rozwój glikoproteomiki [32].

3. Glikozylacja białek w komórkach organizmów eukariotycznych

Glikoproteiny mają olbrzymie znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek eukariotycznych. Szacunki mówią, że stanowią one połowę proteomu [44], a 90% z nich zawiera jednostkę cukrową przyłączoną do atomu azotu asparaginy. Obecność reszt cukrowych w strukturze białka zmienia jego właściwości fizyczne, w tym rozmiar, kształt, stopień sfałdowania, rozpuszczalność i ładunek elektryczny. Biologiczna rola tak zmodyfikowanych białek jest niezwykle istotna w procesach rozwoju, wzrostu i funkcji organizmu. Obecność grup cukrowych chroni białka przed proteolizą i decyduje o czasie ich eliminacji przez wątrobę. Glikozylacja, obok wpływu na sekrecję i sortowanie białek, jest także ważna dla mechanizmu wzajemnego rozpoznawania się komórek oraz dla modulowania aktywności różnych enzymów, receptorów błonowych, transporterów, czynników wzrostu i hormonów [19, 23].

Glikany biorą udział w prawie każdym aspekcie wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Glikozylacji ulegają m.in. białka głównego układu zgodności tkankowej (MHC, Major Histocompatibility Complex) oraz wszystkie przeciwciała w konserwowanych pozycjach ich łańcuchów ciężkich. Odkryto, że zmiany we wzorze glikozylacji fragmentu Fc (fragment, crystallizable) przeciwciała IgG są istotne w procesie starzenia, a także wielu chorobach autoimmunologicznych i nowotworowych [39, 117]. Nieprawidłowości w glikozylacji przeciwciał towarzyszą reumatoidalnemu zapaleniu stawów (RA, Rheumatoid Arthritis) [16], a wrodzone niedobory glikozylacji białek (CDG, Congenital Disorder of Glycosylation) prowadzą do wystąpienia chorób metabolicznych o różnorodnych objawach i zaburzają funkcje wielu układów i narządów [31]. Większość ze 130 opisanych jak dotąd chorób związanych z defektami enzymów na drodze syntezy glikanów jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Główne skutki zaburzeń glikozylacji to opóźnienie wzrostu i rozwoju, hipotonia, dysmorfie twarzy, zaburzenia krzepnięcia krwi i nieprawidłowości układu hormonalnego [15]. Znaczenie tej modyfikacji białek u ludzi podkreśla fakt, że eksperymentalne zablokowanie N-glikozylacji u zwierząt laboratoryjnych jest letalne na wczesnych etapach życia płodowego [89].

W komórkach eukariotycznych proces N-glikozylacji rozpoczyna się w obrębie retikulum endoplazmatycznego (RE). Do difosforanu dolicholu – lipidowego nośnika osadzonego w błonie RE, od strony cytozolowej przyłączany jest rdzeń heptasacharydowy złożony z 5 mannoz i 2 reszt N-acetyloglukozaminy (GlcNAc). W kolejnym etapie ma miejsce odwrócenie orientacji lipidowego nośnika i dobudowanie, już od strony światła RE, kolejnych monosacharydów. Powstały

glikan przenoszony jest na docelowe reszty asparaginy syntetyzowanego białka przy udziale związanego z błoną RE kompleksu białek transmembranowych – transferazy oligosacharydowej (OST, oligosaccharyltransferase). Za enzymatyczną aktywność tego kompleksu białkowego odpowiedzialne jest Stt3p – białko o silnie konserwowanej sekwencji aminokwasowej [60]. N-glikozylowane białko kierowane jest następnie do aparatu Golgiego, gdzie glikan jest dalej przebudowywany przez dodawanie i/lub usuwanie poszczególnych reszt cukrowych, co gwarantuje różnorodność strukturalną [2].

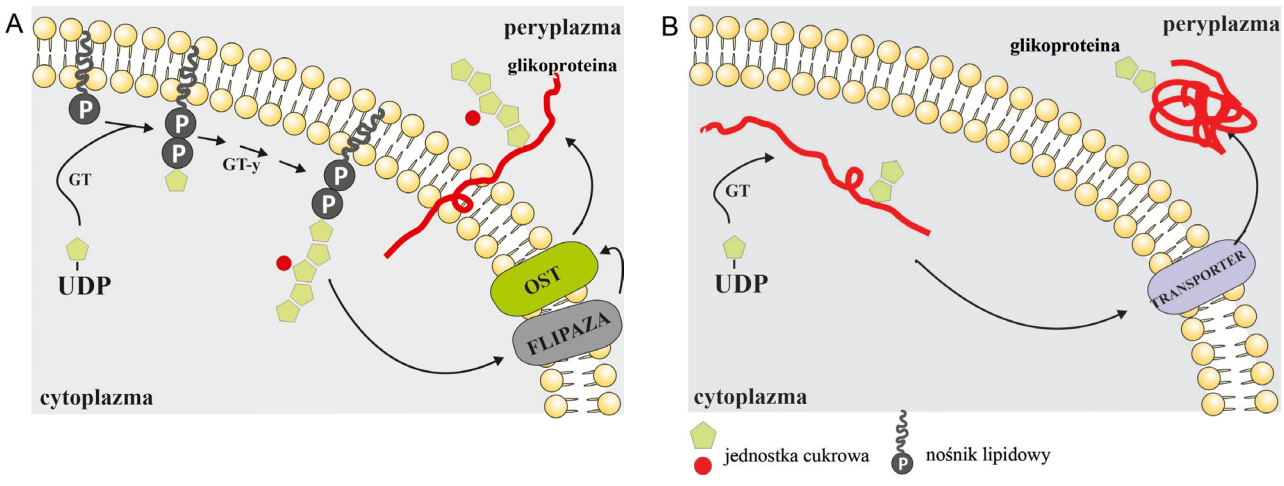
Aparat Golgiego oraz RE to miejsca, w których odbywa się również O-glikozylacja. Proces ten najczęściej zaczyna się od przyłączenia N-acetylogalaktozaminy (GalNAc) do reszt seryny/treoniny. Do niej dobudowywane są kolejne monosacharydy [19]. Przykładem modyfikowanych w ten sposób białek są mucyny, fetuina oraz gonadotropiny [99].

4. Glikozylacja białek u bakterii

Bakterie syntetyzują rozmaite glikokoniugaty. Są to, występujące zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich, peptydoglikan, otoczki polisacharydowe, egzopolisacharyd, czy też charakterystyczne tylko dla jednej z tych grup bakterii: lipopolisacharyd i lipooligosacharyd (Gram-ujemne) oraz kwasy tejchojowe i lipotejchojowe (Gram-dodatnie). Dzięki powierzchniowej lokalizacji i ogromnej różnorodności tworzą one unikalny „kod kreskowy" na powierzchni bakterii, a tym samym pośredniczą w specyficznych interakcjach z otoczeniem. Wiele z tych struktur w przypadku mikroorganizmów chorobotwórczych jest wykorzystywana jako MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns) i pełni kluczową rolę w modulowaniu działania układu immunologicznego.

Do roku 1999 w glikoproteinach zidentyfikowanych w obrębie domeny *Bacteria* stwierdzano wyłącznie obecność wiązania O-glikozydowego. Okazało się jednak, że w skład proteomów bakteryjnych wchodzą także N-glikoproteiny. Pierwszą bakterią, u której opisano szlak N-glikozylacji, był *Campylobacter jejuni*, przedstawiciel Epsilonproteobacteria [101, 115]. Dziś wiadomo, że niemal wszystkie bakterie należące do Epsilonproteobacteria (m.in. *Helicobacter*, *Wolinella, Nitratiruptor*), podobnie jak *Campylobacter* posiadają przynajmniej jeden ortolog transferazy oligosacharydowej (OST), enzymu potrzebnego do przeprowadzenia tej modyfikacji. Takie enzymy wykryto również u przedstawicieli Deltaproteobacteria (np. *Desulfovibrio*), co wskazuje, że system ten jest dużo bardziej powszechny niż początkowo sądzono [83].

Struktura glikanu przyłączonego do białka zależy od zestawu enzymów obecnych w komórce, w której zachodzi modyfikacja. W dobudowywaniu łańcucha oligosacharydowego mogą brać udział hydrolazy, glikozydazy, acetylazy, ale największe znaczenie mają glikozylotransferazy (GT), o czym świadczy ich rozpowszechnienie. Szacunki wskazują, że stanowią one od 1 do 3% wszystkich białek proteomu bakteryjnego. Aktualna klasyfikacja obejmuje 110 rodzin wyodrębnionych na podstawie rodzaju przenoszonego cukru, np. galaktozylotransferazy, mannozylotransferazy [72]. Do utworzenia wiązania glikozydowego określonego typu potrzebna jest zatem konkretna glikozylotransferaza. Miejscem ich działania jest cytoplazma a substratami zaktywowane nukleotydocukry. Produkt działania jednej glikozylotransferazy staje się akceptorem dla następnej, w wyniku czego dochodzi do wydłużenia oligosacharydu. Syntetyzowane glikany są zwykle dość proste, co oznacza, że składają się z jednego rodzaju lub kilku różnych monosacharydów. Po zsyntetyzowaniu glikoproteiny są transportowane przez błonę cytoplazmatyczną. Ten sposób tworzenia glikanu nazwano glikozylacją sekwencyjną (Ryc. 1A) [105]. Nieco inny przebieg ma glikozylacja blokowa (glikozylacja *en-bloc*).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający przebieg glikozylacji
Na rycinie przedstawiono przebieg glikozylacji sekwencyjnej (A) oraz *en block* (B). Skróty: GT – glikozylotranferaza; UDP – urydynodifosforan; OST – transferaza oligosacharydowa.

Tabela I
Przykłady białek N- i O-glikozylowanych w mechanizmie zależnym i niezależnym od obecności transferazy oligosacharydowej

	Enzym	Aktywność enzymu	Akceptor glikanu	Wybrane modyfikowane białka	Glikan	Piśmiennictwo
O-glikozylacja						
Neisseria meningitidis	PglL	OST*	S/T (LCR)	PilE, AniA	diNAcBac- i GATDH-, >30	[64, 90]
Neisseria gonorrhoeae	PglO	OST	S	PilE, MtrC, MtrD, DsbA, HemX, CcoP	diNAcBac-	[5]
Pseudomonas aeruginosa	TfpO/TfpW	GT	S/T	PilA	α,5NβOHC$_4$7NFmPse,4βXyl1, 3βFucNAc	[25, 43]
Francisella tularensis	PglA	OST	S	PilA	HexNAc-Hex-Hex-HexNAc-HexN	[8]
Campylobacter jejuni	ND	ND	S/T	flagelina	Pochodne Pse5Ac7Ac i Leg5Am7Ac	[103]
Listeria monocytogenes	GmaR	GT	T	flagelina	β-GlcNAc	[98]
Helicobacter pylori	ND	ND	S/T	flagelina (FlaA, FlaB)	Pse5Ac7A, Pse5Am7A, Leg5AmNMe7A, pochodne D-Bac	[46]
Clostridium botulinum	ND	ND	S	flagelina	αLeg5GluNMe7Ac	[104]
Burkholderia cenocepacia	PglL	OST	LCR bogate w S, A, P	>23	HexNAc-HexNAc-Hex, b-Gal-(1–3)-a-GalNAc-(1–3)-b-GalNAc-	[69]
Acinetobacter baumannii	PglL	OST	S/T	PilA oraz białka o nieznanej funkcji	GlcNAc3NAcA4OAc4 (βGlcNAc-6-) αGal6β Glc3βGalNAc	[51]
Campylobacter jejuni	ND	ND	T	MOMP	Galβ1,3GalNAcβ1,4GalNAcβ1, 4GalNAcα1	[74]
Escherichia coli	Aah	GT	S/T	AIDA-I, Ag43, TibA	Hep	[9]
N-glikozylacja						
Campylobacter jejuni	PglB	OST	(D/E)-X-N-Y-(S/T)	ZnuA, EptC, MreC, Cme, ok. 78 białek	GalNAc$_3$(Glc)GalNAc$_2$diNAcBac	[14, 82]
Helicobacter pullorum	PglB1	OST	N-X-(S/T)	HgpA + inne peryplazmatyczne/ błonowe	HexNAc-216-217-217-HexNAc	[56]
Haemophilus influenzae	HMW$_1$C, HMW$_2$C	GT	N-X-(S/T)	HMW$_1$A, HMW$_2$A	Glc i Gal	[28, 38]

* α-5NβOHC$_4$7NFmPse: pochodna kwasu pseudoaminowego (5-N-b-hydroxybutyryl-7-Nformyl-pseudaminic acid); αLeg5GluNme7Ac: pochodna kwasu legionaminowego (7-acetamido-5(N-methyl-glutam-4-yl)-amino-3,5,7,9-tetradeoxy-D-glycero-α-D-galacto-nonulosonic acid); β-GlcNAc3NAcA4OAc: 4-O-acylowana pochodna kwasu glukurunowego; bacillozoamina: 2,4-diamino-2,4,6-trideoksy-D-glukoza; diNAcBac: 2,4-diacetamido bacillozoamina; FucNAc: N-acetylofukozamina; Gal: galaktoza; GalNAc: N-acetylogalaktozamina; GATDH: 2-gliceramido 4-acetamido 2,4,6-trideoksyheksoza; Glc: glukoza; GlcNAc: N-acetyloglukozoamina; GT: glikozylotransferaza; Hep: heptoza; Hex: heksoza; HexNAc: N-acetyloheksozoamina; LCR: Low complexity region (region o niskiej złożoności); Leg: kwas legionoaminowy; Man: mannoza; ManNAc: N-acetylomannozamina; Me: grupa metylowa; NB: nie badano; OST: transferaza oligosacharydowa; P: fosforan; Pse5Ac7Ac: kwas pseudoaminowy; Pse5Am7Ac: 5-acetamidyno-7-acetamido-Pse; Xyl: ksyloza.

Wówczas, w wyniku aktywności glikozylotransferaz, na nośniku lipidowym, jakim jest zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej difosforan undekaprenylu, powstaje jednostka oligosacharydowa, która następnie w całości zostaje przeniesiona na łańcuch białkowy. Składanie glikanu zachodzi od strony cytoplazmatycznej, po czym struktura ta ulega odwróceniu, a transfer grupy cukrowej na białko, będący wynikiem aktywności transferazy oligosacharydowej (OST), zachodzi w peryplazmie (Ryc. 1B) [105].

Jeszcze do niedawna uważano, że według mechanizmu sekwencyjnego powstają O-glikoproteiny, natomiast mechanizm blokowy, a więc również obecność OST, jest typowy dla N-glikozylacji. Aktualna wiedza wskazuje, że możliwa jest także N-glikozylacja sekwencyjna. Została ona opisana dla białka HMW1C *Haemophilus influenzae* [37] oraz w komórkach *Actinobacillus pleuropneumoniae* [95]. W ostatnich latach u przedstawicieli rodzaju *Neisseria* opisano także O-glikozylację wg. mechanizmu *en bloc* [105]. Przykłady białek glikozylowanych w mechanizmie zależnym i niezależnym od OST przedstawiono w tabeli I.

4.1. O-glikozylacja w komórkach bakteryjnych

Dominującym typem glikozylacji w świecie organizmów prokariotycznych jest glikozylacja typu O. Występuje w komórkach wielu gatunków bakterii, z których

duża część to organizmy chorobotwórcze (np. *Neisseria*, *Borrelia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Campylobacter* i in.). Podlegają jej przede wszystkim białka powierzchniowe, będące jednocześnie istotnymi czynnikami wirulencji (piliny, flageliny, adhezyny).

O-glikozylacji niezależnej od obecności transferazy oligosacharydowej (OST) ulega głównie flagelina, białko budujące włókna rzęski bakteryjnej, a więc struktury potrzebne komórce bakteryjnej do poruszania się. Szczególną rolę pełnią one u bakterii patogennych – ich brak często uniemożliwia kolonizację tkanek gospodarza. W toku ewolucji u organizmów wyższych powstały mechanizmy umożliwiające rozpoznawanie białkowych monomerów budujących włókno rzęski, co wskazuje na jej istotne znaczenie jako czynnika wirulencji.

Systemy glikozylacji flageliny odnaleziono u wielu bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich rodzajów *Clostridium* i *Listeria* [104]. Wykazują one bardzo dużą różnorodność, co objawia się m.in. w liczbie miejsc akceptorowych czy budowie przyłączanych glikanów. Na przykład *Listeria monocytogenes* glikozyluje flagelinę tylko w jednym miejscu, a w przypadku *Campylobacter* przyłączony składnik cukrowy może stanowić nawet 10% masy tego białka. W komórkach *C. jejuni* do flageliny FlaA może bowiem zostać dołączonych aż 19 grup cukrowych, co czyni ją jednym z najmocniej zmodyfikowanych w ten sposób, zidentyfikowanych do tej pory, białek [103]. Mechanizm przyłączenia glikanu wydaje się bardziej zależeć od dostępności seryny lub treoniny na powierzchni pofałdowanego białka, aniżeli od określonej sekwencji konsensusowej. Badania techniką spektometrii mas wykazały, że glikany są przyłączane w centralnym, wysoko zmiennym regionie flageliny i są eksponowane do środowiska [103].

Większość szczepów z niedoborem glikozylacji nie jest w stanie wytworzyć funkcjonalnej rzęski; wydaje się więc, że glikan umożliwia złożenie struktury i zapewnia jej stabilność [71, 83]. Inaczej jest u *Pseudomonas aeruginosa*. Modyfikacja ta nie wpływa bowiem ani na powstawanie rzęski, ani na ruchliwość komórek *Pseudomonas*. Odnotowano natomiast, że glikozylowana flagelina, w porównaniu do białka pozbawionego tej modyfikacji, wywołuje znacznie wyższą odpowiedź immunologiczną, a szczepy *Pseudomonas* z niedoborem glikozylacji mają obniżoną zjadliwość [6, 109].

W komórkach *Campylobacter* występuje jeden z lepiej zbadanych systemów O-glikozylacji flageliny. Glikany przyłączane do tego białka to jednostki monosacharydowe składające się z jednego z dwóch rzadkich 9-węglowych cukrów, pochodnych kwasu sjalowego: kwasu pseudaminowego (Pse5Ac7Ac, kwas 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoksy-L-manno-nonulosonowy) lub kwasu legionaminowego (Leg5Am7Ac, kwas 5-acetamidyno-7-acetamido-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galakto-nonulosonowy), które mogą być dodatkowo modyfikowane przez dołączenie np. grupy acetylowej, acetamidynowej czy N-acetyloglutaminy [36]. Szczepy *Campylobacter* mogą produkować oba te cukry, albo tylko jeden z nich, co oczywiście zależy od zestawu posiadanych genów w obrębie locus O-glikozylacji. Region ten charakteryzuje się dużą zmiennością. Tak na przykład w komórkach *C. jejuni* NCTC11168 obejmuje on blisko 50 genów, natomiast w obrębie locus O-glikozylacji szczepu 81–176, należącego do tego samego gatunku, znajdują się tylko 24 geny [41]. Oprócz genów biorących udział w biosyntezie kwasu pseudoaminowego (geny *neu,* neuraminic acid genes) [17, 93] i/lub genów zaangażowanych w biosyntezę kwasu legionaminowego (geny *ptm,* post-translational modification genes) [94] w obrębie tego regionu występują m.in. geny rodziny 1318 (*maf*, motility accessory factor), geny rodziny 617 oraz geny kodujące podjednostki strukturalne flageliny FlaA i FlaB [87]. Zarówno geny rodziny 1318 jak i 617 mogą podlegać zmienności fazowej: zawierają w swej sekwencji nukleotydowej powtórzenia, tzw. nieprzewidywalne loci, których obecność doprowadza do poślizgu polimerazy w trakcie replikacji [59, 106]. Może to powodować zmiany strukturalne w glikoproteinach rzęsek.

Glikozylacja flageliny w komórkach *Campylobacter* ma znaczenie dla jej struktury i właściwości immunogennych. Jest niezbędna do biosyntezy funkcjonalnych rzęsek, co umożliwia kolonizację przewodu pokarmowego gospodarza, warunkuje autoaglutynację, formowanie biofilmu, jak również sekrecję czynników wirulencji [29, 40, 67, 77, 103]. Różne rodzaje składników cukrowych na powierzchni flageliny *Campylobacter* umożliwiają specyficzne oddziaływanie komórek tego patogenu ze środowiskiem bądź z organizmem gospodarza [47, 100]. Odporność wrodzona działa w oparciu o istnienie receptorów PRR (Pattern Recognition Receptors), rozpoznających struktury drobnoustrojów zwane PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Jednym z przedstawicieli PRR są receptory TLR (Toll-like receptor), które odgrywają główną rolę w rozpoznaniu zagrożenia i inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Za rozpoznawanie flageliny odpowiedzialny jest receptor TLR5. W odróżnieniu do większości flagelin bakteryjnych, flagelina *Campylobacter* nie jest zdolna do aktywacji receptora TLR5, a zatem unika rozpoznania przez wrodzony układ odpornościowy. Stwierdzono jednak, że glikozylacja flageliny nie odgrywa roli w mechanizmie unikania odporności [24].

O-glikozylacji często podlega białko budujące pilusy typu IV. Przykładem jest pilina chorobotwórczych gatunków *Neisseria*, *Neisseria meningitidis* i *Neisseria gonorrhoeae* [64, 110]. Pilusy *Neisseria* to struktury, które odgrywają rolę w agregacji, ruchliwości, przylganiu i inwazji do komórek gospodarza, tworzeniu biofilmu i modulowaniu odpowiedzi immunologicznej

gospodarza [76]. Stwierdzono, że glikozylacja piliny *N. gonorrhoeae* ma kluczowe znaczenie dla skutecznego zakażenia szyjki macicy [53]. Glikozylotransferazy (np. PglA) *Neisseria* mogą podlegać zmienności fazowej. Prowadzi to do powstania wielu glikoform piliny, czego efektem jest zdolność patogenu do unikania odpowiedzi odpornościowej gospodarza [11]. Badania ostatniej dekady wykazały, że *N. gonorrhoeae*, oprócz piliny, jest w stanie glikozylować co najmniej 19 białek. Niektóre z nich stanowią składniki pomp efflux, których działanie polega na aktywnym wypompowywaniu różnych substancji antybakteryjnych z komórki (m.in. antybiotyków, barwników, detergentów, toksyn) [4, 5, 110]. W komórkach *Neisseria* glikozylacja może przebiegać z udziałem transferazy oligosacharydowej [5, 64, 90]. Enzymy te zostały zidentyfikowane również w genomach *Burkholderia* [69] i *Acinetobacter* [51]. Zaobserwowano, że glikozylacja zachodzi w regionach białka bogatych w reszty alaniny, seryny i proliny, wciąż jednak nie jest znany motyw rozpoznawany przez ten enzym.

4.2. N-glikozylacja w komórkach bakteryjnych

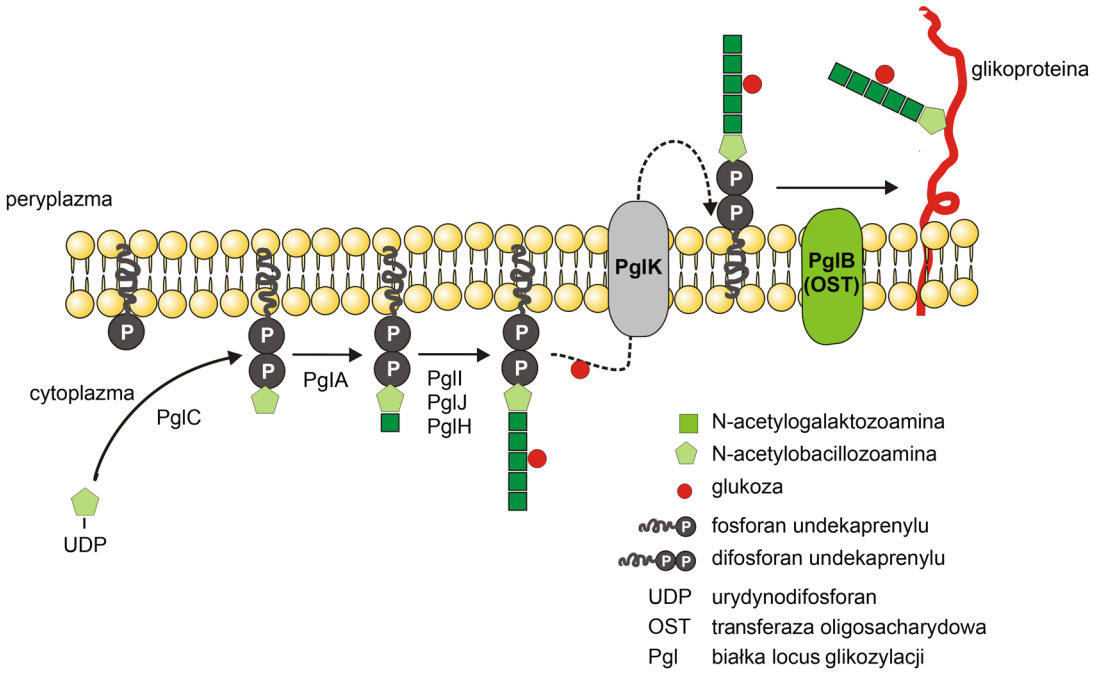
Identyfikacja N-glikozylowanych białek w komórkach bakterii była dość nieoczekiwanym odkryciem. Genomika porównawcza pokazała jednak, że systemy glikozylacji białek są znacznie bardziej powszechne, niż wcześniej sądzono. *Campylobacter jejuni* to mikroorganizm z najlepiej poznanym i opisanym systemem N-glikozylacji oraz pierwsza bakteria, której system został w pełni odtworzony w *Escherichia coli* [112].

C. jejuni jest czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych jelit u ludzi. Większość przypadków kampylobakteriozy jest wynikiem spożycia zanieczyszczonego tymi bakteriami, nieodpowiednio przygotowanego mięsa drobiowego. Znacząca część stosunkowo małego genomu (ok. 1,6 Mbp) tego gatunku bakterii związana jest z biosyntezą glikanów, co powoduje, że komórki *Campylobacter* charakteryzuje dość duży repertuar glikokoniugatów. Na ich powierzchni występują lipooligosacharydy (LOS), z których niektóre imitują budowę ludzkich glikolipidów, peptydoglikan, polisacharydy otoczkowe (CPS) ze złożonymi i nietypowymi cukrami i, jak mówią szacunki, ponad 70 białek, które są potranslacyjnie modyfikowane poprzez przyłączenie N-glikanów [14, 83].

Geny kodujące enzymy uczestniczące w procesie N-glikozylacji są konserwowane i tworzą tzw. locus *pgl*. U *C. coli* i *C. lari* – gatunków najbliżej spokrewnionych z *C. jejuni,* klaster genów *pgl* wygląda niemal identycznie. Organizacja tego regionu w genomach *C. upsaliensis*, *C. fetus i C. curvus* charakteryzuje większa różnorodność. U gatunków tych pomiędzy *pglD* i *pglE* stwierdzono otwarte ramki odczytu (ORF; open reading frame), których produkty prawdopodobnie nie uczestniczą w procesie N-glikozylacji białek. W genomach *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. fetus*, *C. rectus*, *C. showae* i *C. curvus* dodatkowe ORF-y kodują prawdopodobnie glikozylotransferazy i enzymy zaangażowane w biosyntezę oligosacharydów. Natomiast niektóre gatunki *Campylobacter,* np. *C. concisus*, *C. curvus* i *C. gracilis* posiadają dwa ortologi genów *pglB*, zlokalizowane w obrębie locus *pgl* (*C. concisus*, *C. curvus*) lub poza nim (*C. gracilis*) [55].

W komórkach *C. jejuni* struktura glikanu jest formowana w ciągu reakcji katalizowanych przez glikotransferazy, gdzie donorami są cukry związane z urydyno-5'-fosforanem (UDP), a kolejne elementy są przenoszone na Und-PP (difosforanu undekaprenylu) [61]. W pierwszym etapie, w wyniku działania trzech enzymów PglF, PglE i PglD, które przeprowadzają odpowiednio reakcje dehydratacji, transaminacji oraz transacetylacji, z UDP-GlcNAc powstaje 2,4-diacetamino-2,4,6-trideoksy-α-D-glukoza, nazywana inaczej UDP-2,4-diacetaminobacillozaminą (UDP-diNAcBac). Glikozylotransferaza, PglC, przyłącza powstałą UDP-diNAcBac do nośnika lipidowego, zakotwiczonego w błonie wewnętrznej od strony cytoplazmy, w wyniku czego powstaje diNAcBac-α1-PPUnd. Potem następuje seria reakcji przeniesienia GalNAc (N-acetylogalaktozaminy) katalizowanych przez glikozylotransferazy PglA, PglJ i PglH, czego efektem jest wydłużenie łańcucha glikanowego (Und-PP-Bac2,4diNAc-$(GalNAc)_5$) [34]. PglH zachowuje się w tym procesie jak polimeraza, dodając trzy kolejne cząsteczki GalNAc do tworzonego glikanu, łączone wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Ostatnim etapem biosyntezy heptasacharydu, katalizowanej przez PglI, jest przyłączenie β-1,3-glukozy do jednej z reszt GalNAc [55, 81]. Schemat procesu N-glikozylacji w komórkach *Campylobacter* przedstawia Ryc. 2. Powstały oligosacharyd (LLO; lipid-linked oligosaccharide) transportowany jest przez wewnętrzną błonę do przestrzeni peryplazmatycznej przez ATP-zależną flipazę PglK [3, 88]. Za przeniesienie oligosacharydu na docelowe białko odpowiada natomiast transferaza oligosacharydowa PglB [112] – homolog podjednostki Stt3p wchodzącej w skład OST u drożdży [60]. W komórkach *Campylobacter* modyfikowana jest asparagina występująca w motywach Asp/Glu-X_1-Asn-X_2-Ser/Thr, gdzie X_1 i X_2 reprezentują dowolny aminokwas z wyjątkiem proliny [63]. Motyw akceptorowy musi jednak znajdować się na powierzchni białka, w regionie nieuporządkowanym. Bakteryjna transferaza oligosacharydowa, w odróżnieniu od eukariotycznej, jest w stanie transportować glikany na pofałdowane białka [62, 70].

Organizmy eukariotyczne przeprowadzają kontrolę jakości N-glikoprotein; glikany są dalej modyfikowane



Ryc. 2. Schemat szlaku N-glikozylacji u *C. jejuni*

lub przycinane w ER i aparacie Golgiego. Przez długi czas uważano, że taka kontrola i przebudowa nie występują w komórkach organizmów prokariotycznych. W ostatnich latach jednak w komórkach *Campylobacter* zaobserwowano, że glikan może być modyfikowany przez dołączenie fosfoetanolaminy, który to proces jest katalizowany przez transferazę EptC [22, 96].

Znaczenie procesu N-glikozylacji w komórkach mikroorganizmów nie zostało jak dotąd dokładnie wyjaśnione. Jednak, podobnie jak w przypadku organizmów eukariotycznych, oligosacharydowe grupy mogą wywierać wpływ na strukturę i funkcję białka modyfikowanego przez ich dołączenie. Wyniki wielu badań wskazują, że mogą mieć one znaczenie w interakcji z komórkami gospodarza lub otaczającym środowiskiem – pełnią one rolę determinant antygenowych i uczestniczą w zjawiskach biologicznego rozpoznawania i adhezji. Tak na przykład *Campylobacter* ze zinaktywowanym locus N-glikozylacji wykazuje obniżoną adhezję i inwazyjność do linii komórek jelitowych. Zaobserwowano również, że brak glikozylacji wpływa na ograniczenie kolonizacji jelit kurcząt [1, 45, 58, 73]. Badania van Sorge'a pokazują, że N-glikozylacja u *C. jejuni* może prowadzić do zmiany odpowiedzi immunologicznej gospodarza w kontakcie z patogenem. Odkryto, że przyłączony heptasacharyd jest rozpoznawany przez lektynę MGL (macrophage galactose binding lectin). Receptor ten jest zaangażowany w wiązanie glikozylowanych antygenów, ich obróbkę oraz indukcję sygnałów modyfikujących aktywność komórek układu odpornościowego. MGL rozpoznaje zarówno glikoproteiny *C. jejuni* jak i lipooligosacharydy z przyłączonymi terminalnie podstawnikami GalNAc. Obecność mutantów *C. jejuni*, które nie produkowały ligandów dla MGL, powodowała wzrost produkcji interleukiny 6 [107]. Dokładne skutki braku tej modyfikacji ustalono w odniesieniu do nielicznych białek. Jednym z nich jest VirB10, komponent systemu sekrecji typu IV u *C. jejuni*. Glikozylacja tego białka ma zasadnicze znaczenie dla stabilności układu wydzielania i pobierania DNA [66].

Ostatnio przeprowadzona proteomika ilościowa w szczepie *C. jejuni* z mutacją w genie kodującym transferazę oligosacharydową *pglB* wykazała znaczną rearanżację proteomu *C. jejuni*. Usunięcie *pglB* spowodowało zmianę poziomu 185 białek. W przypadku 137 z nich komplementacja przywróciła poziom obserwowany w komórkach typu dzikiego. Odnotowano zmianę w poziomie białek powiązanych z reakcją na stres (ClpB, GroEL, GroES, GrpE i DnaK), chemotaksją, tworzeniem biofilmu, oddychaniem oraz pozyskiwaniem, wykorzystaniem i wykrywaniem składników odżywczych. Brak N-glikozylacji w komórce doprowadził na przykład do wyższego poziomu PutP/PutA odpowiadających za transport i wykorzystanie proliny, i obniżenie poziomu białek DctA/DctB związanych z importem asparaginianu i eksportem bursztynianu. Konsekwencją było przestawienie metabolizmu z wykorzystania asparaginy na wykorzystanie proliny. Mutanty *pglB* znacznie gorzej przeżywały szok termiczny i osmotyczny. Stwierdzono również, że N-glikozylacja jest niezbędna do pełnej aktywności reduktazy azotanowej Nap. Zaobserwowano, że mniejsza ilość tego enzymu nie miała jednak związku ze zmianą poziomu ekspresji

kodującego ją genu. Na tej podstawie zasugerowano, że N-glikozylacja odgrywa rolę w ochronie białek przed działaniem proteaz [13]. Również badania Abouelhadid i wsp. przeprowadzone w roku 2019 wskazują że zakłócenie N-glikozylacji koreluje ze znacznym wzrostem liczby nie tylko peryplazmatycznych, ale także cytoplazmatycznych białek opiekuńczych i proteaz. W badaniach tych potwierdzono poważne upośledzenie funkcji NapAB i zmniejszenie aktywności pompy efflux CmeABC będące konsekwencją braku glikozylacji [1, 26]. Jednocześnie fakt, że niektóre glikoproteiny są stabilne w komórkach niezdolnych do dołączania glikanów, wskazuje, że grupy cukrowe pełnić mogą odmienne role w różnych proteinach.

5. Praktyczne zastosowania glikozylacji białek – glikoinżynieria

W ostatniej dekadzie zainteresowano się możliwością praktycznego wykorzystania bakteryjnych systemów glikozylacji [52, 114]. Z chwilą wprowadzenia genów odpowiadających za tę modyfikację (*pgl*) do komórek *E. coli* i uzyskania funkcjonalnych, rekombinowanych glikoprotein, zaczęła intensywnie rozwijać się glikoinżynieria bakteryjna. Osiągnięcie to próbuje się wykorzystać w dwojaki sposób: do produkcji szczepionek polisacharydowych, jak również poprawy farmakokinetycznych właściwości białek terapeutycznych. W wielu szczepach glikozylowane białka pełnią ważną rolę w procesach patogenezy, co czyni je również potencjalnym celem terapeutycznym – część z enzymów tworzących system O-glikozylacji jest nieobecna w komórkach eukariotycznych.

Komórki *E. coli* zdolne do przeprowadzenia N-glikozylacji uzyskano w 2002 roku. Wacker i wsp. do komórek *E. coli*, oprócz plazmidu niosącego gen kodujący wytypowane do modyfikacji białko, wprowadzili także plazmid niosący locus biosyntezy heptasacharydu *Campylobacter* oraz plazmid z transferazą oligosacharydową PglB pochodzącą z tego gatunku [112]. Grupa cukrowa była syntetyzowana w cytoplazmie na nośniku lipidowym, a po przeniesieniu do peryplazmy, PglB przekazywał polisacharyd do sekwencji akceptorowej docelowego białka [21, 102]. Glikozylacja przebiegała więc według schematu opisanego dla *Campylobacter*. Kolejne badania wykazały, że na terenie glikokompetentnej komórki *E. coli*, transferaza oligosacharydowa ($PglB_{Cj}$) może przenosić różne glikany, nie tylko te powstające w komórkach *Campylobacter* [21]. I tak na przykład wykazano, że PglB transportuje polisacharyd O16 w komórkach *E. coli* tak samo wydajnie jak swój endogenny substrat – heptasacharyd $Glc(GalNAc)_5Bac$ u *C. jejuni* [30] Jedynym ograniczeniem jest wymagana obecność grupy acetylowej przy węglu C2 na redukującym końcu glikanu [111]. Zaobserwowano również, że warunkiem, który musi zostać spełniony by powstająca jednostka cukrowa została przyłączona do białka, jest obecność sekwencji konsensusowej (Asp/Glu-X-Asn-Y-Ser/Thr). W ten sposób uzyskano między innymi glikozylowaną formę podjednostki B toksyny cholery (CtxB) [63]. Białko PglB wykazuje aktywność wobec stosunkowo szerokiej grupy substratów. Jest ono w stanie przenosić glikan nie tylko na dojrzałe białko, ale również krótsze peptydy, o ile zawierają rozpoznawany przez tę transferazę motyw. Technologię tę określa się jako Protein Glycan Coupling Technology (PGCT) [102].

Jednym z potencjalnych zastosowań glikoinżynierii bakteryjnej jest produkcja nowoczesnych szczepionek polisacharydowych. Użycie polisacharydów otoczkowych w charakterze antygenów szczepionkowych wymaga kowalencyjnego przyłączenia do białka nośnikowego, którego przykładem jest CRM_{197} – nietoksyczna, ale immunogenna wersja toksyny błoniczej *Corynebacterium diphteriae*. Zapewnia to zdolność do indukowania odpowiedzi związanej z limfocytami T [68], co przekłada się na większą skuteczność szczepionki u dzieci poniżej drugiego roku życia – grupy wiekowej, w której polisacharydy bez białkowego składnika wywołują bardzo słabą odpowiedź immunologiczną [7]. Metodę tę z powodzeniem wykorzystano do opracowania szczepionek przeciwko m.in. *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) [75] i *Neisseria meningitidis* [12]. Obecnie tworzone są one poprzez chemiczne połączenie białka z polisacharydem wyizolowanym z danego patogenu lub sztucznie zsyntetyzowanym. Podejście to jest jednak kosztowne i czasochłonne, a otrzymane glikany nie mają jednorodnej struktury. Otrzymywanie glikoprotein w układach *in vivo* np. w *E. coli* pozwoliłoby na obniżenie kosztów produkcji szczepionek koniugowanych oraz na ujednolicenie przyłączanych łańcuchów cukrowych.

Technologię PGCT wykorzystano m.in. do stworzenia glikoprotein, które mogłyby zostać wykorzystane jako antygen w szczepionce przeciwko brucelozie [50]. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* i *Brucella suis*, wywołujące brucelozę u ludzi mogą również zarażać zwierzęta domowe, powodując poronienia i bezpłodność, a tym samym prowadzić do znacznych strat ekonomicznych [86]. Do białka AcrA *C. jejuni* dołączono antygen O pochodzący z *Yersinia enterocolitica* O9, który jest identyczny z antygenem O *B. abortus.* Syntezy tej dokonano z użyciem transferazy oligosacharydowej PglB *C. jejuni*. Odpowiedź immunologiczna po podaniu glikoproteiny myszom nie była wystarczająca, by ochronić je przed infekcją wirulentnym szczepem *B. abortus.* Wykazano jednak jej użyteczność w wykrywaniu infekcji u bydła, ludzi i świń. Do kulek magnetycznych opłaszczonych rekombinowanym białkiem wiązały

się przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi O *B. abortus* obecne w surowicy zainfekowanych zwierząt, co pozwalało odróżnić osobniki chore od zdrowych [20, 50]. W podobny sposób glikoinżynieria została wykorzystana do wykrywania zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) [78], wywoływanego przez szczepy *Escherichia coli* wytwarzające toksynę Shiga (STEC). Strategię tą zastosowano również do opracowania szczepionek przeciwko *Shigella dysenteriae* typ 1 [49, 91], *Shigella flexneri* typ 2a [57], *Burkholderia pseudomallei* [33], *Francisella tularensis* [21], *Staphylococcus aureus* [113] oraz *Campylobacter* [80]. Testowanie kilku z nich przyniosło obiecujące wyniki na modelach zwierzęcych [21, 113] a w przypadku szczepionki przeciwko *S. dysenteriae* rozpoczęto badania kliniczne [48, 92].

Wysiłki zmierzające do opracowania glikokompetentnych *E. coli* zakończyły się powodzeniem, jednak w dalszym ciągu wyzwaniem pozostaje uzyskanie wysokiej wydajności N-glikozylacji. Na skuteczność tego procesu wpływa wiele czynników, w tym między innymi obecność sekwencji konsensusowej, aktywność transferaz oligosacharydowych (OST), szlaki metaboliczne gospodarza i warunki hodowli. Garcia-Quintanilla i wsp., by uzyskać większą ilość białka zmodyfikowanego polisacharydami *Burkholderia pseudomalei*, unieczynnili w genomie *E. coli* geny *wecA* i *waaL* [33]. Obecność w komórkach glikokompetentnej *E. coli* inicjującej glikozylotransferazy (*wecA*), która przenosi GlcNAc na nośnik lipidowy (difosforan undekaprenylu, Und-PP), zakłócała syntezę na tym samym lipidzie glikanu, będącego przedmiotem badania. Usunięcie ligazy WaaL, która może przenosić substrat na LPS, także pozytywnie wpłynęło na wydajność glikozylacji. Korzystając z wysokoprzepustowych analiz, Ollis i wsp. zidentyfikowali warianty PglB o zmienionej specyficzności wobec substratu białkowego. Szczególnie interesujące warianty rozpoznawały sekwencję N-X-S/T wykorzystywaną przez eukariotyczne OST, co daje możliwość wykorzystania technologii PGCT do produkcji eukariotycznych glikoprotein [84].

Około 70% białek terapeutycznych, zatwierdzonych klinicznie lub będących w fazie opracowania, to glikoproteiny. Przykładem są: erytropoetyna, przeciwciała monoklonalne, tkankowy aktywator plazminogenu czy ludzka DNAza [18, 65]. N-glikozylacja może być zastosowana do poprawy właściwości farmakokinetycznych i biofizycznych białek. Zmiany te mogą prowadzić do opracowania leków o podwyższonej aktywności *in vivo*, o dłuższym okresie półtrwania, ale także mogą pozytywnie wpływać na stabilność, rozpuszczalność białek czy warunkować odporność na proteolizę. Dzięki glikozylacji białka terapeutyczne mogą być kierowane do konkretnych komórek lub tkanek, bądź może dochodzić do modulowania ich aktywności biologicznej poprzez oddziaływania z określonymi receptorami. Chociaż systemy ekspresyjne ssaków są obecnie preferowanym gospodarzem do wytwarzania glikoprotein terapeutycznych, bakterie mające zdolność do wprowadzania takich modyfikacji pojawiają się jako realna alternatywa w ich produkcji [42]. Więcej informacji na temat możliwości wykorzystania bakteryjnych technik glikoinżynieryjnych przedstawia opracowanie Harding i Feldman z 2019 [42].

6. Podsumowanie

Glikoproteiny, traktowane początkowo jako specyficzne jedynie dla komórek organizmów eukariotycznych, są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród Archaea, jak i Bacteria. W ciągu ostatnich dwóch dekad scharakteryzowano wiele bakteryjnych szlaków glikozylacji. Kluczowe w tych szlakach enzymy – transferazy oligosacharydowe oraz glikozylotransferazy, wykorzystano do projektowania szczepionek glikokoniugatowych. Szlaki biosyntezy glikoprotein, jako że pełnią one wiele funkcji w patogenezie, okazały się także atrakcyjnym celem dla nowych strategii przeciwbakteryjnych. Niewątpliwie rosnąca wiedza na temat glikozylacji białek przyczynia się do powstania narzędzi umożliwiających tworzenie struktur glikanów, które wcześniej były nieosiągalne. A w dłuższej perspektywie manipulacje ścieżkami glikomodyfikacji pozwoli, być może, wytwarzać rekombinowane białka zawierające ludzkie glikany, co z kolei wzmocni ich wartość terapeutyczną.

Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu NCN 2016/21/B/NZ6/01141.

Piśmiennictwo

1. Abouelhadid S., North S.J., Hitchen P., Vohra P., Chintoan-Uta C., Stevens M., Dell A., Cuccui J., Wren B.W.: Quantitative Analyses Reveal Novel Roles for N-Glycosylation in a Major Enteric Bacterial Pathogen. *MBio*, **10**, (2019)
2. Aebi M.: N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2430–2437 (2013)
3. Alaimo C., Catrein I., Morf L., Marolda C.L., Callewaert N., Valvano M.A., Feldman M.F., Aebi M.: Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO J.*, **25**, 967–976 (2006)
4. Anonsen J.H., Vik A., Borud B., Viburiene R., Aas F.E., Kidd S.W., Aspholm M., Koomey M.: Characterization of a Unique Tetrasaccharide and Distinct Glycoproteome in the O-Linked Protein Glycosylation System of *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica*. *J. Bacteriol.* **198**, 256–267 (2016)
5. Anonsen J.H., Vik A., Egge-Jacobsen W., Koomey M.: An extended spectrum of target proteins and modification sites in the general O-linked protein glycosylation system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Proteome Res.* **11**, 5781–5793 (2012)

6. Arora S.K., Neely A.N., Blair B., Lory S., Ramphal R.: Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect. Immun.* **73**, 4395–4398 (2005)
7. Baraldo K., Mori E., Bartoloni A., Norelli F., Grandi G., Rappuoli R., Finco O., Del Giudice G.: Combined conjugate vaccines: enhanced immunogenicity with the N19 polyepitope as a carrier protein. *Infect. Immun*. **73**, 5835–5841 (2005)
8. Barel M., Charbit A.: Role of Glycosylation/Deglycolysation Processes in *Francisella tularensis* Pathogenesis. *Front. Cell Infect. Microbiol*. **7**, 71 (2017)
9. Benz I., Schmidt M.A.: Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol. Microbiol*. **40**, 1403–1413 (2001)
10. Bhat A.H., Maity S., Giri K., Ambatipudi K.: Protein glycosylation: Sweet or bitter for bacterial pathogens? *Crit. Rev. Microbiol.* **45**, 82–102 (2019)
11. Borud B., Viburiene R., Hartley M.D., Paulsen B.S., Egge-Jacobsen W., Imperiali B., Koomey M.: Genetic and molecular analyses reveal an evolutionary trajectory for glycan synthesis in a bacterial protein glycosylation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9643–9648 (2011)
12. Broker M., Dull P.M., Rappuoli R., Costantino P.: Chemistry of a new investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages. *Vaccine*, **27**, 5574–5580 (2009)
13. Cain J.A., Dale A.L., Niewold P., Klare W.P., Man L., White M.Y., Scott N.E., Cordwell S.J.: Proteomics Reveals Multiple Phenotypes Associated with N-linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Cell Proteomics*. **18**, 715–734 (2019)
14. Cain J.A., Dale A.L., Sumer-Bayraktar Z., Solis N., Cordwell S.J.: Identifying the targets and functions of N-linked protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Omics*. **16**, 287–304 (2020)
15. Chang I.J., He M., Lam C.T.: Congenital disorders of glycosylation. *Ann. Transl. Med*. **6**, 477 (2018)
16. Chludzinska A., Chrostek L., Cylwik B.: The alterations of proteins glycosylation in rheumatic diseases. *Pol. Merkur. Lekarski*, **33**, 112–116 (2012)
17. Chou W.K., Dick S., Wakarchuk W.W., Tanner M.E.: Identification and characterization of NeuB3 from *Campylobacter jejuni* as a pseudaminic acid synthase. *J. Biol. Chem*. **280**, 35922–35928 (2005)
18. Cook M.C., Kaldas S.J., Muradia G., Rosu-Myles M., Kunkel J.P.: Comparison of orthogonal chromatographic and lectin-affinity microarray methods for glycan profiling of a therapeutic monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B. Technol. Biomed. Life Sci*. **997**, 162–178 (2015)
19. Corfield A.: Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem. Cell Biol*. **147**, 119–147 (2017)
20. Cortina M.E., Balzano R.E., Rey Serantes D.A., Caillava A.J., Elena S., Ferreira A.C., Nicola A.M., Ugalde J.E., Comerci D.J., Ciocchini A.E.: A bacterial glycoengineered antigen for improved serodiagnosis of porcine brucellosis. *J. Clin. Microbiol*. **54**, 1448–1455 (2016)
21. Cuccui J., Thomas R.M., Moule M.G., D'Elia R.V., Laws T.R., Mills D.C., Williamson D., Atkins T.P., Prior J.L., Wren B.W.: Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against *Francisella tularensis*. *Open Biol*. **3**, 130002 (2013)
22. Cullen T.W., O'Brien J.P., Hendrixson D.R., Giles D.K., Hobb R.I., Thompson S.A., Brodbelt J.S., Trent M.S.: EptC of *Campylobacter jejuni* mediates phenotypes involved in host interactions and virulence. *Infect. Immun*. **81**, 430–440 (2013)
23. Cummings R.D.: Stuck on sugars – how carbohydrates regulate cell adhesion, recognition, and signaling. *Glycoconj. J*. **36**, 241–257 (2019)
24. de Zoete M.R., Keestra A.M., Wagenaar J.A., van Putten J.P.: Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem*. **285**, 12149–12158 (2010)
25. DiGiandomenico A., Matewish M.J., Bisaillon A., Stehle J.R., Lam J.S., Castric P.: Glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin: glycan substrate specificity. *Mol. Microbiol*. **46**, 519–530 (2002)
26. Dubb R.K., Nothaft H., Beadle B., Richards M.R., Szymanski C.M.: N-glycosylation of the CmeABC multidrug efflux pump is needed for optimal function in *Campylobacter jejuni*. *Glycobiology*, **30**, 105–119 (2020)
27. Eichler J., Koomey M.: Sweet New Roles for Protein Glycosylation in Prokaryotes. *Trends Microbiol.* **25**, 662–672 (2017)
28. Elango D., Schulz B.L.: Phase-Variable Glycosylation in Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J. Proteome Res*. **19**, 464–476 (2020)
29. Ewing C.P., Andreishcheva E., Guerry P.: Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81–176. *J. Bacteriol*. **191**, 7086–7093 (2009)
30. Feldman M.F., Wacker M., Hernandez M., Hitchen P.G., Marolda C.L., Kowarik M., Morris H.R., Dell A., Valvano M.A., Aebi M.: Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 3016–3021 (2005)
31. Freeze H.H.: Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. *J. Biol. Chem*. **288**, 6936–6945 (2013)
32. Gabius H.J., Roth J.: An introduction to the sugar code. *Histochem. Cell Biol*. **147**, 111–117 (2017)
33. Garcia-Quintanilla F., Iwashkiw J.A., Price N.L., Stratilo C., Feldman M.F.: Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery. *Front. Microbiol.* **5**, 381 (2014)
34. Glover K.J., Weerapana E., Chen M.M., Imperiali B.: Direct biochemical evidence for the utilization of UDP-bacillosamine by PglC, an essential glycosyl-1-phosphate transferase in the *Campylobacter jejuni* N-linked glycosylation pathway. *Biochemistry*, **45**, 5343–5350 (2006)
35. Godzik A.: Metagenomics and the protein universe. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **21**, 398–403 (2011)
36. Goon S., Kelly J.F., Logan S.M., Ewing C.P., Guerry P.: Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Mol. Microbiol*. **50**, 659–671 (2003)
37. Grass S., Lichti C.F., Townsend R.R., Gross J., St Geme J.W., 3rd: The *Haemophilus influenzae* HMW1C protein is a glycosyltransferase that transfers hexose residues to asparagine sites in the HMW1 adhesin. *PLoS Pathog*. **6**, e1000919 (2010)
38. Gross J., Grass S., Davis A.E., Gilmore-Erdmann P., Townsend R.R., St Geme J.W., 3rd: The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is a glycoprotein with an unusual N-linked carbohydrate modification. *J. Biol. Chem*. **283**, 26010–26015 (2008)
39. Gudelj I., Lauc G., Pezer M.: Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*. **333**, 65–79 (2018)
40. Guerry P.: *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* **15**, 456–461 (2007)
41. Guerry P., Ewing C.P., Schirm M., Lorenzo M., Kelly J., Pattarini D., Majam G., Thibault P., Logan S.: Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol. Microbiol*. **60**, 299–311 (2006)

42. Harding C.M., Feldman M.F.: Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*. *Glycobiology*, **29**, 519–529 (2019)
43. Harvey H., Bondy-Denomy J., Marquis H., Sztanko K.M., Davidson A.R., Burrows L.L.: *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nat. Microbiol*. **3**, 47–52 (2018)
44. Helenius A., Aebi M.: Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem*. **73**, 1019–1049 (2004)
45. Hendrixson D.R., DiRita V.J.: Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol*. **52**, 471–484 (2004)
46. Hopf P.S., Ford R.S., Zebian N., Merkx-Jacques A., Vijayakumar S., Ratnayake D., Hayworth J., Creuzenet C.: Protein glycosylation in *Helicobacter pylori*: beyond the flagellins? *PLoS One*, **6**, e25722 (2011)
47. Howard S.L., Jagannathan A., Soo E.C., Hui J.P., Aubry A.J., Ahmed I., Karlyshev A., Kelly J.F., Jones M.A., Stevens M.P. i wsp.: *Campylobacter jejuni* glycosylation island important in cell charge, legionaminic acid biosynthesis, and colonization of chickens. *Infect. Immun*. **77**, 2544–2556 (2009)
48. Huttner A., Hatz C., van den Dobbelsteen G., Abbanat D., Hornacek A., Frolich R., Dreyer A.M., Martin P., Davies T., Fae K. i wsp.: Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial. *Lancet Infect. Dis*. **17**, 528–537 (2017)
49. Ihssen J., Kowarik M., Dilettoso S., Tanner C., Wacker M., Thony-Meyer L.: Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact*. **9**, 61 (2010)
50. Iwashkiw J.A., Fentabil M.A., Faridmoayer A., Mills D.C., Peppler M., Czibener C., Ciocchini A.E., Comerci D.J., Ugalde J.E., Feldman M.F.: Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis. *Microb. Cell Fact*. **11**, 13 (2012)
51. Iwashkiw J.A., Seper A., Weber B.S., Scott N.E., Vinogradov E., Stratilo C., Reiz B., Cordwell S.J., Whittal R., Schild S. i wsp.: Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog*. **8**, e1002758 (2012)
52. Jaffe S.R., Strutton B., Levarski Z., Pandhal J., Wright P.C.: *Escherichia coli* as a glycoprotein production host: recent developments and challenges. *Curr. Opin. Biotechnol*. **30**, 205–210 (2014)
53. Jennings M.P., Jen F.E., Roddam L.F., Apicella M.A., Edwards J.L.: *Neisseria gonorrhoeae* pilin glycan contributes to CR3 activation during challenge of primary cervical epithelial cells. *Cell Microbiol*. **13**, 885–896 (2011)
54. Jensen O.N.: Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **7**, 391–403 (2006)
55. Jervis A.J., Butler J.A., Lawson A.J., Langdon R., Wren B.W., Linton D.: Characterization of the structurally diverse N-linked glycans of *Campylobacter* species. *J. Bacteriol*. **194**, 2355–2362 (2012)
56. Jervis A.J., Wood A.G., Cain J.A., Butler J.A., Frost H., Lord E., Langdon R., Cordwell S.J., Wren B.W., Linton D.: Functional analysis of the *Helicobacter pullorum* N-linked protein glycosylation system. *Glycobiology*, **28**, 233–244 (2018)
57. Kampf M.M., Braun M., Sirena D., Ihssen J., Thony-Meyer L., Ren Q.: *In vivo* production of a novel glycoconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in recombinant *Escherichia coli*: identification of stimulating factors for *in vivo* glycosylation. *Microb. Cell Fact*. **14**, 12 (2015)
58. Karlyshev A.V., Everest P., Linton D., Cawthraw S., Newell D.G., Wren B.W.: The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology*, **150**, 1957–1964 (2004)
59. Karlyshev A.V., Linton D., Gregson N.A., Wren B.W.: A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella--mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **148**, 473–480 (2002)
60. Kelleher D.J., Karaoglu D., Mandon E.C., Gilmore R.: Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell*. **12**, 101–111 (2003)
61. Kelly J., Jarrell H., Millar L., Tessier L., Fiori L.M., Lau P.C., Allan B., Szymanski C.M.: Biosynthesis of the N-linked glycan in *Campylobacter jejuni* and addition onto protein through block transfer. *J. Bacteriol*. **188**, 2427–2434 (2006)
62. Kowarik M., Numao S., Feldman M.F., Schulz B.L., Callewaert N., Kiermaier E., Catrein I., Aebi M.: N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science*, **314**, 1148–1150 (2006)
63. Kowarik M., Young N.M., Numao S., Schulz B.L., Hug I., Callewaert N., Mills D.C., Watson D.C., Hernandez M., Kelly J.F. i wsp.: Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J*. **25**, 1957–1966 (2006)
64. Ku S.C., Schulz B.L., Power P.M., Jennings M.P.: The pilin O-glycosylation pathway of pathogenic *Neisseria* is a general system that glycosylates AniA, an outer membrane nitrite reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **378**, 84–89 (2009)
65. Lalonde M.E., Durocher Y.: Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J. Biotechnol*. **251**, 128–140 (2017)
66. Larsen J.C., Szymanski C., Guerry P.: N-linked protein glycosylation is required for full competence in *Campylobacter jejuni* 81–176. *J. Bacteriol*. **186**, 6508–6514 (2004)
67. Lertsethtakarn P., Ottemann K.M., Hendrixson D.R.: Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol*. **65**, 389–410 (2011)
68. Lesinski G.B., Westerink M.A.: Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J. Microbiol. Methods*. **47**, 135–149 (2001)
69. Lithgow K.V., Scott N.E., Iwashkiw J.A., Thomson E.L., Foster L.J., Feldman M.F., Dennis J.J.: A general protein O-glycosylation system within the *Burkholderia cepacia* complex is involved in motility and virulence. *Mol. Microbiol*. **92**, 116–137 (2014)
70. Lizak C., Gerber S., Numao S., Aebi M., Locher K.P.: X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature*, **474**, 350–355 (2011)
71. Logan S.M.: Flagellar glycosylation – a new component of the motility repertoire? *Microbiology*, **152**, 1249–1262 (2006)
72. Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B.: The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic. Acids Res*. **42**, D490–495 (2014)
73. Lu Q., Li S., Shao F.: Sweet Talk: Protein Glycosylation in Bacterial Interaction With the Host. *Trends Microbiol*. **23**, 630–641 (2015)
74. Mahdavi J., Pirinccioglu N., Oldfield N.J., Carlsohn E., Stoof J., Aslam A., Self T., Cawthraw S.A., Petrovska L., Colborne N. i wsp.: A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biol*. **4**, 130202 (2014)
75. Makela P.H., Kayhty H., Leino T., Auranen K., Peltola H., Ekstrom N., Eskola J.: Long-term persistence of immunity after immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine*, **22**, 287–292 (2003)

76. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H.: Pili in Gram--positive bacteria: assembly, involvement in colonization and bioilm development. *Trends Microbiol.* **16**, 33–40 (2008)
77. McNally D.J., Hui J.P., Aubry A.J., Mui K., Guerry P., Brisson J.R., Logan S.M., Soo E.C.: Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81–176 using a focused metabolomics approach. *J. Biol. Chem*. **281**, 18489–18498 (2006)
78. Melli L.J., Ciocchini A.E., Caillava A.J., Vozza N., Chinen I., Rivas M., Feldman M.F., Ugalde J.E., Comerci D.J.: Serogroup--specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of shiga toxin-producing-*Escherichia coli*-associated hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol*. **53**, 528–538 (2015)
79. Nagar R., Rao A.: An iterative glycosyltransferase EntS catalyzes transfer and extension of O- and S-linked monosaccharide in enterocin 96. *Glycobiology*, **27**, 766–776 (2017)
80. Nothaft H., Davis B., Lock Y.Y., Perez-Munoz M.E., Vinogradov E., Walter J., Coros C., Szymanski C.M.: Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Sci. Rep*. **6**, 26511 (2016)
81. Nothaft H., Liu X., McNally D.J., Szymanski C.M.: N-linked protein glycosylation in a bacterial system. *Methods Mol. Biol*. **600**, 227–243 (2010)
82. Nothaft H., Scott N.E., Vinogradov E., Liu X., Hu R., Beadle B., Fodor C., Miller W.G., Li J., Cordwell S.J. i wsp.: Diversity in the protein N-glycosylation pathways within the *Campylobacter* genus. *Mol. Cell Proteomics*. **11**, 1203–1219 (2012)
83. Nothaft H., Szymanski C.M.: Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat. Rev. Microbiol*. **8**, 765–778 (2010)
84. Ollis A.A., Zhang S., Fisher A.C., DeLisa M.P.: Engineered oligosaccharyltransferases with greatly relaxed acceptor-site specificity. *Nat. Chem. Biol*. **10**, 816–822 (2014)
85. Oman T.J., Boettcher J.M., Wang H., Okalibe X.N., van der Donk W.A.: Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nat. Chem. Biol*. **7**, 78–80 (2011)
86. Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M., Tsianos E.: Brucellosis. *N. Engl. J. Med*. **352**, 2325–2336 (2005)
87. Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S. i wsp.: The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, **403**, 665–668 (2000)
88. Perez C., Kohler M., Janser D., Pardon E., Steyaert J., Zenobi R., Locher K.P.: Structural basis of inhibition of lipid-linked oligosaccharide flippase PglK by a conformational nanobody. *Sci. Rep*. **7**, 46641 (2017)
89. Pinho S.S., Reis C.A.: Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer*. **15**, 540–555 (2015)
90. Power P.M., Seib K.L., Jennings M.P.: Pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis* occurs by a similar pathway to wzy-dependent O-antigen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **347**, 904–908 (2006)
91. Ravenscroft N., Haeuptle M.A., Kowarik M., Fernandez F.S., Carranza P., Brunner A., Steffen M., Wetter M., Keller S., Ruch C. i wsp.: Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli*. *Glycobiology*, **26**, 51–62 (2016)
92. Riddle M.S., Kaminski R.W., Di Paolo C., Porter C.K., Gutierrez R.L., Clarkson K.A., Weerts H.E., Duplessis C., Castellano A., Alaimo C. i wsp.:Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: a single-blind, randomized phase I study. *Clin. Vaccine Immunol*. **23**, 908–917 (2016)
93. Salah Ud-Din A.I.M., Roujeinikova A.: Flagellin glycosylation with pseudaminic acid in *Campylobacter* and *Helicobacter*: prospects for development of novel therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci*. **75**, 1163–1178 (2018)
94. Schoenhofen I.C., Vinogradov E., Whitfield D.M., Brisson J.R., Logan S.M.: The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: biosynthesis involving novel GDP-linked precursors. *Glycobiology*, **19**, 715–725 (2009)
95. Schwarz F., Fan Y.Y., Schubert M., Aebi M.: Cytoplasmic N-glycosyltransferase of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is an inverting enzyme and recognizes the NX(S/T) consensus sequence. *J. Biol. Chem*. **286**, 35267–35274 (2011)
96. Scott N.E., Nothaft H., Edwards A.V., Labbate M., Djordjevic S.P., Larsen M.R., Szymanski C.M., Cordwell))) S.J.: Modification of the *Campylobacter jejuni* N-linked glycan by EptC protein-mediated addition of phosphoethanolamine. *J. Biol. Chem*. **287**, 29384–29396 (2012)
97. Shcherbakova A., Tiemann B., Buettner F.F., Bakker H.: Distinct C-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1 repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2574–2579 (2017)
98. Shen A., Kamp H.D., Grundling A., Higgins D.E.: A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes Dev*, **20**, 3283–3295 (2006)
99. Spiro R.G.: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, **12**, 43R–56R (2002)
100. Stephenson H.N., Mills D.C., Jones H., Milioris E., Copland A., Dorrell N., Wren B.W., Crocker P.R., Escors D., Bajaj-Elliott M.: Pseudaminic acid on *Campylobacter jejuni* flagella modulates dendritic cell IL-10 expression via Siglec-10 receptor: a novel flagellin-host interaction. *J. Infect. Dis*. **210**, 1487–1498 (2014)
101. Szymanski C.M., Yao R., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P.: Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol*. **32**, 1022–1030 (1999)
102. Terra V.S., Mills D.C., Yates L.E., Abouelhadid S., Cuccui J., Wren B.W.: Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine design. *J. Med. Microbiol*. **61**, 919–926 (2012)
103. Thibault P., Logan S.M., Kelly J.F., Brisson J.R., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P.: Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem*. **276**, 34862–34870 (2001)
104. Twine S.M., Paul C.J., Vinogradov E., McNally D.J., Brisson J.R., Mullen J.A., McMullin D.R., Jarrell H.C., Austin J.W., Kelly J.F. i wsp.: Flagellar glycosylation in *Clostridium botulinum*. *FEBS J.* **275**, 4428–4444 (2008)
105. Tytgat H.L., Lebeer S.: The sweet tooth of bacteria: common themes in bacterial glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **78**, 372–417 (2014)
106. van Alphen L.B., Wuhrer M., Bleumink-Pluym N.M.C., Hensbergen P.J., Deelder A.M., van Putten J.P.M.: A functional *Campylobacter jejuni maf4* gene results in novel glycoforms on flagellin and altered autoagglutination behaviour. *Microbiology*, **154**, 3385–3397 (2008)
107. van Sorge N.M., Bleumink N.M., van Vliet S.J., Saeland E., van der Pol W.L., van Kooyk Y., van Putten J.P.: N-glycosylated proteins and distinct lipooligosaccharide glycoforms of *Campylobacter jejuni* target the human C-type lectin receptor MGL. *Cell Microbiol*. **11**, 1768–1781 (2009)
108. Venugopal H., Edwards P.J., Schwalbe M., Claridge J.K., Libich D.S., Stepper J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Pascal S.M.: Structural, dynamic, and chemical characterization

of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry*, **50**, 2748–2755 (2011)
109. Verma A., Arora S.K., Kuravi S.K., Ramphal R.: Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect. Immun*. **73**, 8237–8246 (2005)
110. Vik A., Aas F.E., Anonsen J.H., Bilsborough S., Schneider A., Egge-Jacobsen W., Koomey M.: Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4447–4452 (2009)
111. Wacker M., Feldman M.F., Callewaert N., Kowarik M., Clarke B.R., Pohl N.L., Hernandez M., Vines E.D., Valvano M.A., Whitfield C. i wsp.: Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7088–7093 (2006)
112. Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W. i wsp.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793 (2002)
113. Wacker M., Wang L., Kowarik M., Dowd M., Lipowsky G., Faridmoayer A., Shields K., Park S., Alaimo C., Kelley K.A. i wsp.: Prevention of *Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **209**, 1551–1561 (2014)
114. Yates L.E., Mills D.C., DeLisa M.P.: Bacterial Glycoengineering as a Biosynthetic Route to Customized Glycomolecules. (w) Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg. 2018, s. 1–34
115. Young N.M., Brisson J.R., Kelly J., Watson D.C., Tessier L., Lanthier P.H., Jarrell H.C., Cadotte N., St Michael F., Aberg E. i wsp.: Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem*. **277**, 42530–42539 (2002)
116. Yuan J., O'Donoghue P., Ambrogelly A., Gundllapalli S., Sherrer R.L., Palioura S., Simonovic M., Soll D.: Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. *FEBS Lett.* **584**, 342–349 (2010)
117. Zabczynska M., Pochec E.: The role of protein glycosylation in immune system. *Post. Biochem.* **61**, 129–137 (2015)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 151–159
DOI: 10.21307/PM-2021.60.2.12

WPŁYW MIKROBIOTY UKŁADU ROZRODCZEGO NA PŁODNOŚĆ ŻEŃSKĄ I MĘSKĄ. ROLA BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*

Aneta Kiecka[1]*, Barbara Macura[2], Marian Szczepanik[1]

[1] Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Katedra Biologii Medycznej
[2] Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w marcu 2021 r.

Streszczenie: Od dawna wiadomo, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią dominujący składnik mikrobioty pochwy i pełną ochronną rolę dla mikrośrodowiska pochwy. Obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* potwierdzono również w górnej części układu rozrodczego żeńskiego oraz w męskim układzie rozrodczym i w spermie. Niniejsza praca stanowi przegląd najnowszej literatury dotyczącej wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na płodność, z uwzględnieniem zarówno czynnika żeńskiego, jak i męskiego. Rola mikrobioty może okazać się niezwykle istotna w przypadkach niepłodności idiopatycznej. Najnowsze doniesienia wskazują na możliwy związek pomiędzy obecnością bakterii z rodzaju *Lactobacillus* a efektywnością technik wspomaganego rozrodu. Wyniki badań potwierdzają, że środowisko mikrobiologiczne układu rozrodczego to ważny a zarazem słabo poznany czynnik wpływający na płodność człowieka.

1. Wprowadzenie 2. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym. 3. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym. 4. Mikrobiota nasienia 5. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w nasieniu. 6. Mikrobiota a niepłodność idiopatyczna 7. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* a efektywność technik wspomaganego rozrodu. 8. Podsumowanie

THE INFLUENCE OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM MICROBIOTA ON FEMALE AND MALE FERTILITY. THE ROLE OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA

Abstract: It is well known, that vaginal microbiota is dominated by *Lactobacillus* genus. These bacteria protect a vaginal microenvironment against the invading pathogens. The presence of *Lactobacillus* communities was already confirmed in an upper female reproductive system, as well as in the male reproductive system and semen. In this paper we present the current state of knowledge about the influence of the *Lactobacillus* species on female and male fertility. We also discuss the possible role of the reproductive system microbiota in an idiopathic infertility, and the association between *Lactobacillus* species and effectiveness of assisted reproductive techniques. Further research on the relationship between the reproductive system microbiota and human fertility is needed.

1. Introduction. 2. *Lactobacillus* bacteria in the female reproductive system 3. The role of *Lactobacillus* bacteria in the female reproductive system. 4. Semen microbiota 5. The role of *Lactobacillus* bacteria in semen 6. Microbiota and idiopathic infertility. 7. *Lactobacillus* bacteria and the effectiveness of assisted reproductive techniques. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Lactobacillus,* niepłodność idiopatyczna, płodność, techniki wspomaganego rozrodu
Keywords: *Lactobacillus*, idiopatic infertility, fertility, assisted reproductive techniques

1. Wprowadzenie

Organizm człowieka i mikroorganizmy mikrobioty stanowią skomplikowany i zróżnicowany system wzajemnych zależności i interakcji. Wraz z szybkim rozwojem technik molekularnych możliwe jest poznanie składu mikrobioty w poszczególnych narządach i układach organizmu człowieka, dotychczas często uważanych za sterylne. W ciągu ostatnich lat podjęto intensywne badania nad rolą mikrobioty w patogenezie różnych schorzeń, w tym również chorób cywilizacyjnych. Do tej grupy schorzeń zalicza się między innymi otyłość, cukrzycę, nowotwory, choroby układu krążenia, depresję, a także zaburzenia płodności [34, 35]. Protekcyjna rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pochwie jest od dawna znana, niemniej jednak dokładny mechanizm działania oraz możliwy wpływ na płodność nie jest do końca jasny i wymaga dalszych badań. Najnowsze wyniki badań wskazują również na obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pozostałych częściach układu rozrodczego żeńskiego oraz w nasieniu [14, 58, 59]. Ich wpływ na utrzymanie płodności u obu płci nadal pozostaje niejasny. Innym niezwykle obiecującym obszarem badań jest wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na efektywność technik wspomaganego rozrodu (assisted reproductive technology, ART) [58, 59].

* Autor korespondencyjny: Aneta Kiecka, Katedra Biologii Medycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kopernika 7a, 31-034 Kraków; e-mail: aneta.kiecka@uj.edu.pl

2. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym

W 1892 roku Albert Döderlein po raz pierwszy opisał obecność Gram-dodatnich bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pochwie zdrowych kobiet w wieku rozrodczym. Bakterie te nazywamy obecnie pałeczkami kwasu mlekowego lub pałeczkami Döderlein'a [57, 68]. Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje wiele gatunków, które są niezwykle zróżnicowane morfologicznie. Bakterie te są fakultatywnymi beztlenowcami, kolonizującymi zarówno powierzchnię nabłonka pochwy, jak i przewodu pokarmowego oraz jamy ustnej ludzi i zwierząt [62, 68].

Skład mikrobioty pochwy zmienia się w czasie życia kobiety. Po porodzie naturalnym, przez pierwsze dwa tygodnie życia u noworodków płci żeńskiej, występują w pochwie pałeczki *Lactobacillus* pochodzące z dróg rodnych matki. Obecne są również mikroorganizmy tlenowe tj.: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* oraz bakterie mlekowe tj.: względnie beztlenowe *Enterococcus*. Natomiast wśród beztlenowców są obecne bakterie z rodzaju: *Peptococcus* i *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Eubacteria*, *Propionibacterium* i *Bacteroides* [21, 23]. W okresie dojrzewania kobiet wzrost syntezy estrogenów sprzyja proliferacji i dojrzewaniu komórek nabłonka pochwy oraz akumulacji w nich glikogenu. Glikogen jest katabolizowany przez ludzką α-amylazę do maltozy, maltotriozy i α-dekstryn, które następnie są metabolizowane do kwasu mlekowego przez pałeczki *Lactobacillus*. Tworzy to kwaśne środowisko pochwy (pH 3,5–4,5), sprzyjające rozwojowi pałeczek kwasu mlekowego kosztem patogennych bakterii. Ponadto zmiany składu mikrobioty pochwy można obserwować także w trakcie cyklu miesiączkowego. Wiadomo, że w okresie rozrodczym poziom estrogenów zmienia się w trakcie cyklu. Najwyższe poziomy estrogenów występują tuż przed owulacją, a najniższe w czasie miesiączki. Estrogeny powodują między innymi wzrost syntezy glikogenu w komórkach nabłonka pochwy. Glikogen, jak już wspomniano, stanowi substrat dla bakterii *Lactobacillus*, i produkcji kwasu mlekowego, który zakwasza środowisko pochwy. Różnice w poziomach estrogenów i zawartości glikogenu w komórkach pochwy w czasie cyklu miesiączkowego mogą wpływać na skład mikrobioty pochwy. Mikrobiota pochwy wydaje się być bardziej stabilna w czasie, kiedy poziomy estrogenów przyjmują najwyższe wartości, a mniej stabilna w czasie miesiączki. Zjawisko to jest związane z wahania wartości pH w czasie cyklu. W trakcie miesiączki obserwuje się wzrost pH pochwy spowodowane obecnością krwi menstruacyjnej i tymczasowe zmniejszenie ilości pałeczek *Lactobacillus*. Dominacja *Lactobacilli* maleje wraz ze spadkiem poziomu estrogenów w okresie menopauzy, podczas stosowania antykoncepcji hormonalnej lub innych zaburzeń hormonalnych [4, 18, 44].

Mikrobiota pochwy zdrowych kobiet w wieku rozrodczym stanowi biomasę około miliarda bakterii na gram wydzieliny pochwowej. Cechuje się ona niewielką bioróżnorodnością. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią około 99,97% wszystkich bakterii zasiedlających pochwę, przy czym najpowszechniejsze gatunki to: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* oraz *Lactobacillus jensenii* [14, 36, 48, 42].W klasyfikacji CST wyróżnia się kilka typów mikrobioty pochwy (community state types, CST). CST-I (45,4%), CST-II (8,2%), CST-III (26,8%) i CST-V (9,3%) są zdominowane odpowiednio przez *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* i *L. jensenii* [51]. W grupie CST-IV (10,3%), w której *Lactobacillus* nie jest gatunkiem dominującym, charakterystyczna jest obecność takich bakterii jak: *Gardnerella*, *Pretovella*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Atopobium*, *Streptococcus*, *Dialister*, *Lachnospira*, *Anaerococcus*, *Petoniphilus*, *Eggerthella*, *Finegoldia Rhodobaca*, *Anaerotruncus*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Aerococcus*, *Parvimonas*, *Staphylococcus*, *Corynobacterium*, *Veillonella* [18, 27, 51]. Analiza mikrobioty pochwy kobiet w wieku rozrodczym, z różnych grup etnicznych, wykazała, że odsetek kobiet, u których wykryto dominację bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosi około 90% w populacji białej, 80% w populacji azjatyckiej, 60% w populacji latynoskiej i 37–60% w populacji afroamerykańskiej. Zróżnicowanie to może być skutkiem zarówno predyspozycji genetycznych, jak i czynników geograficznych, ekonomicznych i społecznych [6, 50].

W ostatnich latach potwierdzono obecność mikroorganizmów mikrobioty nie tylko w pochwie, ale także w pozostałych odcinkach układu rozrodczego kobiet [9, 14, 58, 63]. Badania Chen i wsp. z 2017 roku wykazały obecność w szyjce macicy głównie bakterii *Lactobacillus* (> 97,56%). W macicy zidentyfikowano pałeczki *Lactobacillus* (30,6%), *Pseudomonas* (9,09%), *Acinetobacter* (9,07%), *Vagococcus* (7,29%), *Sphingobium* (5,0%), natomiast w jajowodach wykazano obecność *Acinetobacter* (18,27%), *Comamonas* (11,49%), *Pseudomonas* (9,9%), *Pseudomonadaceae* (9,1%), *Dysgonnomonas* (5,11%) [14]. Kolejne badania z 2018 roku i 2019 roku potwierdziły obecność bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* nie tylko w pochwie, lecz również w pozostałych odcinkach żeńskiego układu rozrodczego [11, 29, 40]. Wykazano, że mikrobiota pochwy charakteryzuje się większą liczebnością bakterii, ale też mniejszą ich bioróżnorodnością w porównaniu z pozostałymi odcinkami żeńskiego układu rozrodczego.

3. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* dominują w prawidłowej mikrobiocie pochwy. Wypełniając tą niszę, utrudniają kolonizację innym bakteriom. Obniżenie

liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pochwie prowadzi do dysbiozy, która jest zaburzeniem równowagi w składzie mikrobioty. Ponadto *Lactobacillus* produkuje różne substancje, które dodatkowo utrudniają wzrost patogennych bakterii [6, 45, 47].

Głównym czynnikiem o działaniu przeciwbakteryjnym w pochwie jest kwas mlekowy. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzają dwie jego odmiany izomeryczne: kwas D-mlekowy i L-mlekowy, przy czym kwas D-mlekowy wykazuje silniejsze działanie ochronne. Kwas mlekowy zakwasza wydzielinę pochwy (do około pH < 4), utrudniając w ten sposób wiązanie innych mikroorganizmów z komórkami nabłonka pochwy oraz wywołując autofagię w komórkach nabłonka w celu degradacji mikroorganizmów wewnątrzkomórkowych. Kwas mlekowy wpływa na blokowanie deacetylazy histonów, pobudzając transkrypcję genów i naprawę DNA [4, 10, 67]. Ze względu na swoje właściwości kwas mlekowy hamuje rozwój infekcji oportunistycznych wywołanych przez *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes simplex* (HSV), *Human papillomavirus* (HPV) i *Human immunodeficiency* virus (HIV) [1, 43]. Kwas mlekowy wykazuje również właściwości immunomodulujące, poprzez indukcję odpowiedzi przeciwzapalnej w komórkach nabłonka pochwy i szyjki macicy dzięki hamowaniu wydzielania interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 8 (IL-8) oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF-α), o których wiadomo, że promują replikację wirusa HIV [61].

Nadtlenek wodoru (H2O2) jest związkiem o szerokim działaniu przeciwbakteryjnym, wytwarzanym przez wiele izolatów pałeczek kwasu mlekowego. Wykazano, że 94–95% szczepów *L. crispatus* i *L. jensenii* wytwarza H_2O_2 [62]. H_2O_2 wykazuje wysoką aktywność *in vitro* przeciwko *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*. Produkowany przez *Lactobacilli* H_2O_2 może hamować lub niszczyć inne szczepy bakterii pochwowych, zwłaszcza te z ograniczoną ekspresją enzymów rozkładających H_2O_2 w tym m.in. bezwzględne beztlenowce *Prevotella*, *Peptostreptococus* i *Gardnerella*. Brak H_2O_2 w pochwie powoduje wzrost populacji katalazo-ujemnych organizmów, co jest związane ze zwiększonym ryzykiem infekcji układu moczowopłciowego, w tym zapalenia pochwy i zakażenia HIV [4, 7, 57].

Pochwowe *Lactobacilli* uwalniają także inne substancje ważne dla utrzymania homeostazy mikrobioty pochwy, takie jak bakteriocyny. Są to białka lub kompleksy białek wykazujące silne działanie bakteriobójcze, które swoim działaniu przypominają antybiotyki Bakteriocyny zabijają patogeny poprzez hamowanie syntezy DNA, RNA i białek lub zakłócenie gradientu pH i potencjału membranowego. Bakteriocyny hamują rozwój niepożądanych w pochwie bakterii, miedzy takich jak: *G. vaginalis*, *E. coli*, *C. albicans* [7, 15, 28].

Ciekawe zagadnienie stanowi gatunek *L. iners*, który jest identyfikowany zarówno w zdrowej pochwie, jak i w pochwie w stanie dysbiozy [4]. Gatunek ten porównując do pozostałych pałeczek kwasu mlekowego nie posiada zdolności do wytwarzania kwasu D-mlekowego oraz nadtlenku wodoru. Powszechnie wiadomo, że produkcja tych związków jest jednym z mechanizmów, dzięki którym pałeczki *Lactobacillus* mogą zapobiegać kolonizacji pochwy przez patogenne bakterie [17]. Mikrobiota zdominowana przez *L. iners* może powodować zwiększenie ryzyka zakażeń przenoszonych drogą płciową takimi mikroorganizmami jak *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, HIV oraz HSV-2 [17, 48, 49].

4. Mikrobiota nasienia

Nasienie, będące mieszaniną plemników oraz wielu substancji, również odżywczych, pochodzących z wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych, stanowi idealne środowisko dla wzrostu mikroorganizmów. Substancje te to między innymi: cukry, w tym fruktoza, lipidy, białka, witaminy, prostaglandyny czy jony nieorganiczne. Fruktoza to podstawowe źródło energii dla plemników, ale jest również wykorzystywana przez mikroorganizmy jako substancja odżywcza. Wbrew wcześniejszemu przekonaniu, nasienie nie jest sterylne, a obecność mikroorganizmów w spermie nie zawsze jest równoznaczna z obniżeniem płodności czy rozwojem infekcji [25, 59].

W układzie rozrodczym męskim bakterie występują głównie w cewce moczowej oraz w spermie. Istnieją doniesienia wskazujące, że mikrobiota spermy oraz cewki moczowej różnią się. Cewka moczowa charakteryzuje się obecnością bakterii pochodzących z okolic odbytu oraz ze skóry partnera i są to między innymi *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* oraz pałeczki Gram-ujemne. Źródłem mikrobioty nasienia może być infekcja układu moczowego lub płciowego, ale także bakterie docierające do układu rozrodczego męskiego drogą krwi z innych narządów lub bakterie pochodzące z kobiecej pochwy. Badania wskazują na dużą międzyosobniczą zmienność w składzie mikrobioty spermy. Nie do końca również wiadomo, jak mikrobiota nasienia zmienia się w czasie u tego samego mężczyzny [24, 37, 59]. Co ciekawe, postuluje się również obecność mikroorganizmów w jądrze [2]. Mikrobiota nasienia jest bardziej zróżnicowana, niż mikrobiota pochwy, ale zawiera mniejszą liczbę bakterii w porównaniu ze środowiskiem pochwy [38]. Obecnie można wyróżnić trzy główne profile mikrobiologiczne nasienia: profil bogaty w bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, profil bogaty w bakterie z rodzaju *Prevotella* oraz profil bogaty w bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Wysoka zawartość bakterii z rodzaju *Lactobacillus*

w spermie koreluje z lepszymi parametrami nasienia, niż w pozostałych dwóch profilach [8, 16, 46]. Wyniki badań, przeprowadzone przez Weng'a i wsp. również wykazały, że w większości próbek spermy bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowiły największy udział procentowy bakterii. W spermie występowały także w znacznej ilości bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Prevotella* oraz *Gardnerella.* Podobne obserwacje poczynił Weng wykazując, iż ilość bakterii *Lactobacillus* była skorelowana z prawidłowymi parametrami nasienia [66].

Najczęściej spotykane rodzaje bakterii w spermie to: *Ralstonia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Clostridiales*, *Atopobium*, *Anaerococcus*, *Gardnerella*, *Rhodanobacter*, *Finegoldia*, *Haemophilus*, *Planococcaceae* i *Burkholderia* [16, 24]. Zaobserwowano, że niska jakość nasienia koreluje z obecnością takich bakterii jak *Anaerococcus*, *Bacteroides ureolyticus* i *Proteobacteria*, podczas gdy w nasieniu azoospermicznym wykrywane są bakterie z rodzaju *Bacteroidetes* i *Firmicutes* [24, 59]. Obecnie trudno jest określić jednoznaczną granicę pomiędzy prawidłowym a patologicznym składem mikrobioty nasienia. Wiele rodzajów bakterii występujących w nasieniu, występuje również w pochwie partnerki np. *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Atopobium*, co świadczy o tym, że partnerzy seksualni mogą wymieniać się swoją mikrobiotą [56]. Co więcej, skład mikrobioty nasienia i pochwy również może nie być stały i ulegać zmianom w czasie [24]. Odczyn nasienia jest lekko zasadowy, a tym samym stanowi bardziej sprzyjające środowisko dla bakterii niż pochwa, w której pH jest silnie kwaśne [38, 64]. Istnieją doniesienia wskazujące, że suplementacja bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* poprawia ruchliwość plemników i obniża poziom fragmentacji ich DNA [60].

Na skład mikrobioty nasienia wpływają między innymi wiek inicjacji seksualnej, aktualny wiek, dieta, nawyki higieniczne, zwyczaje seksualne, a także miejsce zamieszkania. Zaobserwowano, że mikrobiota nasienia wpływa na ruchliwość plemników oraz integralność ich materiału genetycznego. Należy również pamiętać o możliwości wzajemnego transferu mikroorganizmów w czasie stosunku płciowego pomiędzy partnerami. Jak już wspomniano, macica również nie jest sterylnym narządem, a modyfikacja jej mikrobioty przez nasienie może wpływać na rozwój zarodka [39, 59].

W chwili obecnej u około 45% przypadków nie udaje się ustalić etiologii nieprawidłowych parametrów nasienia. Dolna granica referencyjna dla podstawowych parametrów nasienia to: objętość nasienia – 1,5 ml, całkowita liczba plemników – 39×10^6/ejakulat, koncentracja plemników – 15×10^6/ml oraz całkowita ruchliwość plemników – 40% [26]. Być może lepsze poznanie mikrobioty nasienia i jej działania pozwoli lepiej zrozumieć przyczyny zaburzeń płodności męskiej. Niestety, pomimo znanego wpływu mikroorganizmów na infekcje przenoszone drogą płciową, mikrobiota układu rozrodczego męskiego jest wciąż o wiele słabiej poznana, niż mikrobiota układu rozrodczego żeńskiego [46].

5. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w nasieniu

Lactobacillus jest bakterią, która zarówno w żeńskim, jak i męskim układzie rozrodczym jest prawidłowym składnikiem mikrobioty i stanowi fizjologiczne mikrośrodowisko dla gamet. Obecnie coraz częściej uważa się, że równoczesne oznaczenie składu mikrobioty obu partnerów jest niezbędne w czasie diagnostyki przyczyn niepłodności [59].

Wang i wsp. przeprowadzili badania nad wpływem bakterii, wyizolowanych z wydzieliny pochwy, na ruchliwość plemników *in vitro.* Wszystkie bakterie posiadały zdolność adhezji do plemników, ale ze względu na dominującą ilość *Lactobacillus* w wydzielinie pochwy, to ten rodzaj stanowił przeważającą część bakterii na powierzchni plemników. Bakterie ulegające adhezji do plemników znacząco ograniczają ruchliwość gamet, co może sugerować ich ograniczający efekt na płodność męską. Autorzy konkludują, że w przypadku, gdy plemniki wykazują prawidłową morfologię i funkcje jest to ważny czynnik selekcyjny, ograniczający nieprawidłowym plemnikom (które w pewny zakresie występują w każdym fizjologicznym ejakulacie) szanse na zapłodnienie. W przypadku spermy o nieprawidłowych parametrach adhezja bakterii do błony komórkowej plemników może znacznie utrudniać poczęcie dziecka [64].

Interesujące doświadczenie, badające wpływ mikrobioty nasienia na mikrobiotę pochwy, przeprowadzili Mändar i wsp. Od każdej pary pobrano 3 próbki materiału: próbkę nasienia, próbkę wydzieliny z pochwy przed stosunkiem i próbkę wydzieliny pochwy po stosunku. Wyniki potwierdziły, że mikrobiota nasienia charakteryzuje się większą różnorodnością i mniejszą liczebnością w stosunku do mikrobioty pochwy. Uzyskane wyniki wskazują również, że ilość bakterii z gatunku *L. crispatus* w pochwie po stosunku może ulec obniżeniu, co może być związane z alkalizacją środowiska pochwy. Ponadto może dojść do mechanicznego przeniesienia bakterii z okolicy krocza do pochwy [38].

W chwili obecnej nie jest jasne jakie mechanizmy odpowiadają za protekcyjny wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na plemniki. Jedną z możliwości jest wpływ na układ immunologiczny gospodarza. Tezę tę wydają się potwierdzać wyniki analizy parametrów nasienia u mężczyzn zdrowych i mężczyzn zarażonych wirusem HIV. U mężczyzn zakażonych wirusem HIV stwierdzono obniżoną liczbę i różnorodność bakterii w spermie. Wartości te uległy poprawie po terapii antywirusowej. U mężczyzn tych zaobserwowano również

korelację pomiędzy poziomem niektórych cytokin, a obecnością bakterii w nasieniu. Inne badania wskazują, że szczep *L. gasseri* może, poprzez indukcję ekspresji określonych genów, wywierać efekt antyoksydacyjny. Być może *Lactobacillus* stanowi nie tylko źródło aktywnych, prozdrowotnych substancji, ale wypełnia także niszę w mikrośrodowisku, która w przeciwnym razie zostałaby zajęta przez szkodliwe dla zdrowia mikroorganizmy. Ponadto nie do końca jest jasne, czy zmieniony skład mikrobioty nasienia powoduje zaburzenia płodności, czy nieprawidłowe środowisko męskiego układu rozrodczego i wcześniejsze zaburzenia w jego funkcjonowaniu wywołują zmiany w składzie mikrobioty [46].

Podobnie jak w przypadku mikrobioty żeńskiego układu rozrodczego dalsze badania powinny odpowiedzieć na pytania, nie tylko jakie mikroorganizmy wchodzą w skład mikrobioty nasienia, ale również jaki jest pełny skład metagenomu, transkryptomu i proteomu. Ponadto sekwencjonowanie całych metagenomów umożliwia dokładne poznanie prawidłowego składu mikrobiologicznego nasienia i jego znaczenia dla płodności męskiej [46].

6. Mikrobiota a niepłodność idiopatyczna

Niepłodność stała się obecnie jedną z chorób cywilizacyjnych. Problem ten dotyka około 10–16% osób w wieku rozrodczym. Szacuje się, że nawet w około 20–30% przypadków nie udaje się znaleźć przyczyny niepłodności, a stan taki nazywamy niepłodnością idiopatyczną [34, 35].

Poszukiwanie przyczyn niepłodności idiopatycznej stanowi duże wyzwanie dla naukowców i lekarzy. W obszarze ich zainteresowań znajdują się między innymi szeroko pojęte przyczyny epigenetyczne i środowiskowe. Innym kierunkiem badań nad przyczynami niepłodności jest wpływ mikrobioty układu rozrodczego żeńskiego i męskiego na płodność. Analiza tego problemu stała się możliwa między innymi dzięki dynamicznemu rozwojowi molekularnych technik diagnostycznych. Stało się to początkiem kompleksowych badań mikrobioty układu rozrodczego w całym układzie rozrodczym u obu płci. Możliwość dokładnej i szybkiej analizy genomu bakterii umożliwiła analizę wpływu poszczególnych gatunków i szczepów bakterii na płodność [58, 59].

Dotychczasowe wyniki badań na tym polu są obiecujące. Zaobserwowano, iż kobiety ze stwierdzoną niepłodnością o charakterze idiopatycznym wykazywały zmieniony skład mikrobioty pochwy w porównaniu z kobietami płodnymi. U kobiet płodnych bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* dominowały w mikrobiocie pochwy. Ponadto wykazano różne wzorce dominacji gatunków *Lactobacillus*, z przewagą *L. crispatus*, jako markera zdrowego środowiska pochwy lub *L. iners* i *L. gasseri*, związane z mikrośrodowiskiem, podatnym na dysbioz. Co ciekawe, dominacja *L. crispatus* była czynnikiem silnie związanym z powodzeniem implantacji zarodka [5, 54]. Inne badania wykazały, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* sprzyjają zajściu w ciążę. Wykazano również, że obecność bakterii beztlenowych w pochwie, w tym *Atopobium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Ureaplasma* i *Escherichia* jest powiązana z patogenezą idiopatycznej niepłodności [13].

Wee i wsp. przeanalizowali próbki wymazów z pochwy, szyjki macicy i endometrium od kobiet niepłodnych i płodnych. Badanie to wykazało, że Ureaplasma i Gardnerella były bardziej obfite u niepłodnych kobiet [65]. Moreno i Simon dokonali przeglądu dotyczącego znaczenia mikrobioty endometrium dla zdrowia kobiet, ze szczególnym uwzględnieniem niepłodności. Wydaje się, że mikrobiota endometrium ma wpływ na implantację zarodka i utrzymanie ciąży. Niska liczebność *Lactobacillus* wiąże się z niepowodzeniem implantacji. Z klinicznego punktu widzenia rozpoznanie dysbiozy endometrium może stanowić nową przyczynę niepłodności kobiet [41].

W ostatnich latach uwagę skupiono na możliwym związku między mikrobiotą a niepłodnością męską. W badaniu Lundy i wsp. sprawdzono czy istnieje związek między mikrobiotą a idiopatyczną niepłodnością męską. W niniejszej pracy określono mikrobiom jelitowy, moczowy i nasienia niepłodnych mężczyzn. Okazało się, że niepłodni mężczyźni mieli zmniejszoną liczbę *Anaerococcus* w wymazach z odbytnicy i zwiększoną liczbę *Aerococcus* w nasieniu, w porównaniu z płodnymi mężczyznami. Wykazano także, że obecność *Prevotella* negatywnie wpływa na jakość plemników [33].

Nasienie ma unikalny mikrobiom, jednak jego pochodzenie i funkcja wymagają dalszych badań, aby zrozumieć jego rolę w zdrowiu i chorobach. Zmiany w składzie bakteryjnym nasienia są powiązane z różnymi zaburzeniami, w tym obniżoną płodnością i niską jakością nasienia, zapaleniem gruczołu krokowego i zakażeniem wirusem HIV. Mikrobiota nasienia może zatem wpływać na zdrowie pary [3].

Dzięki badaniom mikrobioty być może skuteczniej będzie można leczyć zaburzenia płodności, między innymi poprzez precyzyjną regulację składu mikrobioty układu rozrodczego, co może być istotne dla par z niewyjaśnioną przyczyną niepowodzeń prokreacyjnych.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* a efektywność technik ART

Efektywność technik wspomaganego rozrodu (assisted reproductive technology, ART), często podawana jako współczynnik uzyskanych ciąż, jest stosunkowo

niewielka i wynosi około 25–35%. Oznacza to, że tylko 25–35% kobiet zajdzie w ciążę w wyniku pierwszego transferu zarodka do macicy. Jest to wynik niezadowalający, zwłaszcza biorąc pod uwagę obciążenie fizyczne i emocjonalne pary, a także koszty finansowe. Obecnie dąży się do znalezienia czynników, wpływających na powodzenie technik wspomaganego rozrodu oraz taką ich modyfikację, by efektywność tych technik wzrosła. Znalezienie takich czynników nie jest jednak proste. Jednym z obiecujących kierunków badań jest wpływ mikrobioty układu rozrodczego kobiety i mężczyzny na uzyskanie ciąży [29, 30, 55].

Wpływ mikrobioty pochwy na powodzenie ART był badany między innymi przez Koedooder'a i wsp. W niniejszym badaniu od kobiet, leczących się z powodu niepłodności, uzyskiwano wymaz z pochwy, a następnie przeprowadzano procedurę zapłodnienia pozaustrojowego. Następnie dokonywano analizy składu mikrobiologicznego pochwy, a rezultaty zestawiano z wynikiem zapłodnienia pozaustrojowego (*in vitro* fertilization, IVF). W odniesieniu do rodzaju *Lactobacillus* autorzy zaobserwowali, że całkowita ilość tego rodzaju bakterii < 20% tworzy niesprzyjający uzyskaniu ciąży profil mikrobiologiczny pochwy. Z kolei ilość bakterii z gatunku *L. crispatus* < 60% tworzy sprzyjający uzyskaniu ciąży profil mikrobiologiczny pochwy. Te pozornie sprzeczne wyniki autorzy tłumaczą tym, że różne gatunki *Lactobacillus* mogą różnić się zdolnością do produkcji kwasu mlekowego, a tym samym zakwaszania środowiska, co stwarza środowisko niekorzystne dla innych bakterii. Przykładowo *L. crispatus* ma najwyższe zdolności zakwaszania w porównaniu z *L. iners*, *L. jensenii* oraz *L. gasseri*. Warto zaznaczyć, że niekorzystny profil mikrobiologiczny pochwy często nie daje żadnych objawów klinicznych [29].

Przedstawione dane stanowią pewnego rodzaju czynnik predykcyjny odnośnie prawdopodobieństwa uzyskania ciąży. Wyniki te można również potraktować jako wskazówkę do zmiany środowiska mikrobiologicznego pochwy przed zapłodnieniem pozaustrojowym, na przykład poprzez stosowanie odpowiednich probiotyków. Pytanie, które się nasuwa, to czy doprowadzi to do zwiększenia szansy na uzyskanie ciąży. Autorzy zastanawiają się również, czy powyższe wyniki można przenieść na prawdopodobieństwo pojawienia się ciąży, uzyskanej w sposób naturalny [29].

Powyższe obserwacje znalazły swoje potwierdzenie również w innych badaniach. Wymazy z pochwy, pobrane przed transferem zarodka, zawierały większą liczbę bakterii z rodzaju *Lactobacillus* u pacjentek, u których uzyskano ciąże po IVF. U kobiet, u których nie uzyskano ciąży, stwierdzono zwiększoną liczbę m.in. bakterii rodzaju Gardnerella [10].

Dowiedziono również, że kobiety charakteryzujące się nieprawidłowym składem mikrobioty pochwy wykazują około 1,4 razy mniejsze szanse na zajście w ciążę po zastosowaniu technik ART w porównaniu z kobietami z prawidłowym składem mikrobioty [53].

Badania wykazują, że aż u 19% niepłodnych kobiet diagnozowane jest bakteryjne zapalenie pochwy (bacterial vaginosis, BV). Jest to zaburzenie w ekosystemie pochwy, którego charakterystyczną cechą jest nadmierny wzrost ilości bakterii innych niż *Lactobacillus*, głównie beztlenowych, takich jak *G. vaginalis* i *Atopobium vaginae*. BV może negatywnie wpływać na kliniczny wskaźnik ciąż u pacjentek poddawanych IVF. Wykazano, że jedynie 9% pacjentek ze zdiagnozowanym BV zaszło w ciążę po zastosowaniu techniki IVF. Według Haahr i wsp. wszystkie pacjentki przed rozpoczęciem procedur IVF powinny zostać poddane badaniom w kierunku dysbiozy pochwy i w razie nieprawidłowego wyniku, powinny zostać poddane leczeniu [22].

Reasumując, obecność specyficznych Lactobacilli i wiązana z tym właściwa wartość pH wydaje się być czynnikiem niezwykle istotnym w utrzymaniu homeostazy pochwy i uzyskaniu pozytywnych wyników IVF. Obecność bakterii z gatunku *G. vaginalis* i *Ureaplasma* sp. prowadzi do dysbiozy pochwy i niepowodzeń w technikach wspomaganego rozrodu [20, 52].

Nowym i niezwykle intersującym zagadnieniem jest badanie wpływu mikrobioty macicy na powodzenie ART. Obecnie trwają próby określenia prawidłowego składu mikrobioty macicy i oceny jego wpływu na płodność. Stwierdzono, że brak dominacji *Lactobacillus* i przerost *Gardnerella*, *Atopbium* i *Prevotella* mają silny związek z niepowodzeniem IVF. Przywrócenie korzystnej mikrobioty macicy, zdominowanej przez *Lactobacillus*, może poprawić wyniki reprodukcyjne [12, 19, 20, 31].

W jednym z badań opisano mikrobiotę endometrium jako zdominowaną przez *Lactobacillus* (*Lactobacillus* dominated microbiota, LDM) lub niezdominowaną przez *Lactobacillus* (non *Lactobacillus* dominated microbiota, NLDM). Wyniki tego badania nie udowadniają jednoznacznie korzyści z dominacji *Lactobacillus* w endometrium w odniesieniu do liczby uzyskanych ciąż. Sugeruje się jednak, że endometrium zdominowane przez *Lactobacillus* może korzystnie wpływać na proces implantacji. Badania takie mają istotne znaczenie w określeniu prawidłowego i nieprawidłowego składu mikrobiologicznego endometrium [32].

Nie można również zapomnieć o roli nasienia w ART. Jak opisano powyżej, nasienie nie jest sterylne i co więcej, może zawierać mikroorganizmy nawet po procedurach przygotowujących spermę do zapłodnienia pozaustrojowego. W przypadku technik wspomaganego rozrodu może to mieć szczególne znaczenie, ponieważ procedury te omijają naturalne mechanizmy obronne, działające w drogach rozrodczych żeńskich. Zagrożenie to próbuje się zminimalizować poprzez

specjalne przygotowanie nasienia oraz dodatek antybiotyków do odczynników używanych w technikach ART. Niejasne jest jednak, jak powszechne jest występowanie bakterii w nasieniu, używanym w technikach ART, jaka jest ilość tych bakterii ani jak one wpływają na powodzenie zapłodnienia pozaustrojowego [55].

Wyniki badań przeprowadzone przez Štšeptovą i wsp. potwierdziły, że zarówno nasienie, jak i odczynniki używane do procedur ART zawierają bakterie. Najliczniej występującą bakterią w pobranym nasieniu oraz w medium do przeprowadzania procedury zapłodnienia *in vitro* był *Lactobacillus.* Rezultaty tych obserwacji wskazują, że zapłodnienie w warunkach *in vitro* nie zachodzi w sterylnym środowisku a także, że obecność takich bakterii jak *Staphylococcus* i *Alphaproteobacteria* koreluje z jakością nasienia i embrionu [55].

7. Podsumowanie

Najbardziej rozpowszechnioną bakterią, występującą w stanie fizjologicznym, zarówno w żeńskim, jak i męskim układzie rozrodczym, są bakterie z rodzaju *Lactobacillus.* Ich protekcyjna rola w utrzymaniu płodności jest lepiej poznana u kobiet, niż u mężczyzn, jednak mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko są nadal słabo poznane. Zbadanie i zrozumienie tych mechanizmów ma szczególne znaczenie, zwłaszcza obecnie, kiedy zaburzenia płodności są coraz powszechniejszym problemem zdrowotnym, a nie zawsze ich przyczyna zostaje zdiagnozowana. Rola i wpływ pozostałych bakterii mikrobioty, obecnych w drogach rozrodczych, na płodność znajduje się na etapie badań. Ponadto coraz więcej doniesień wskazuje na możliwość wzajemnej interakcji pomiędzy mikrobiotą żeńską a męską, a jej wpływ na zdrowie reprodukcyjne pozostaje nieznane. Być może regulacja składu środowiska mikrobiologicznego układu rozrodczego przyjdzie z pomocą w uzyskaniu ciąży. Wyjaśnienie tych zagadnień może w niektórych przypadkach umożliwić wybór odpowiedniej terapii i zwiększyć szanse na uzyskanie potomstwa, również w procedurach zapłodnienia pozaustrojowego.

Piśmiennictwo:

1. Aldunate M., Tyssen D., Johnson A., Zakir T., Sonza S., Moench T., Cone R., Tachedjian G.: Vaginal concentrations of lactic acid potently inactivate HIV. *J. Antimicrob. Chemother*. **68**, 2015–2025 (2013)
2. Alfano M., Salonia A. i wsp.: Testicular microbiome in azoospermic men-first evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum. Reprod*. **33**, 1212–1217 (2018)
3. Altmäe S., Franasiak J.M., Mändar R.: The seminal microbiome in health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **16**, 703–721 (2019)
4. Amabebe E., Anumba DOC.: The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Front. Med*. doi:10.3389/fmed.2018.00181 (2018)
5. Amato V., Mancini N. i wsp.: Differential composition of vaginal microbiome, but not of seminal microbiome, is associated with successful intrauterine insemination in couples with idiopathic infertility: A Prospective observational study. *Open Forum Infect. Dis.* doi:10.1093/ofid/ofz525 (2020)
6. Anahtar M.N., Gootenberg D.B., Mitchell C.M., Kwon D.S.: Cervicovaginal microbiota and reproductive health: The virtue of simplicity. *Cell Host Microbe.* **23**,159–168 (2018)
7. Aroutcheva A., Gariti D., Simon M., Shott S., Faro J., Simoes J.A., Gurguis A., Faro S.: Defense factors of vaginal Lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol*. **185**, 375–379 (2001)
8. Baud D., Pattaroni C., Vulliemoz N., Castella V., Marsland B.J., Stojanov M.: Sperm microbiota and its impact on semen parameters, *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2019.00234 (2019)
9. Benner M., Ferwerda G., Joosten I., van der Molen R.G.: How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Hum. Reprod. Update*. **24,** 393–415 (2018)
10. Bernabeu A., Bernabeu R. i wsp.: Effect of the vaginal microbiome on the pregnancy rate in women receiving assisted reproductive treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.* **36**, 2111–2119 (2019)
11. Bracewell-Milnes T., Saso S., Nikolaou D., Norman-Taylor J., Johnson M., Thum MY.: Investigating the effect of an abnormal cervico-vaginal and endometrial microbiome on assisted reproductive technologies: A systematic review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **80**, e13037 (2018)
12. Brandão P., Gonçalves-Henriques M.: The impact of female genital microbiota on fertility and assisted reproductive treatments. *J. Fam. Reprod. Health*. **14**, 131–149 (2020)
13. Campisciano G., Florian F., D'Eustacchio A., Stanković D., Ricci G., De Seta F., Comar M.: Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1681–1688 (2017)
14. Chen C., Jia H. i wsp.: The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat. Commun*. doi: 10.1038/s41467-017-00901-0 (2017)
15. Deplanche M., Berkova N. i wsp.: Staphylococcus aureus induces DNA damage in host cell. *Sci. Rep*. doi:10.1038/s41598-019-44213-3 (2019)
16. Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J.W., Jayasena C.N., Minhas S.: The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*. doi: 10.1111/andr.12886 (2020)
17. France MT, Mendes-Soares H, Forney LJ. Genomic Comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. *Appl. Environ. Microbiol*. **21**, 24: 7063–7073 (2016)
18. Gajer P., Ravel J.: Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci. Transl. Med*. **4**, 132ra52 (2012)
19. Garcia-Grau I., Perez-Villaroya D., Bau D., Gonzalez-Monfort M., Vilella F., Moreno I., Simon C.: Taxonomical and functional assessment of the endometrial microbiota in a context of recurrent reproductive failure: A case report. *Pathogens*, **8**, 205 (2019)
20. García-Velasco J.A., Budding D., Campe H., Malfertheiner S.F., Hamamah S., Santjohanser C., Schuppe-Koistinen I., Nielsen H.S., Vieira-Silva S., Laven J.: The reproductive microbiome – clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod. Biomed.* **41**, 443–453 (2020)
21. Gerstner, G.J., Grünberger, W., Boschitsch, E., Rotter M.: Vaginal organisms in prepubertal children with and without vulvovaginitis. *Arch. Gynecol.* **231**, 247–252 (1982)

22. Haahr T., Jensen J.S., Thomsen L., Duus L., Rygaard K., Humaidan P.: Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Human Reprod.* **31**, 795–803 (2016)
23. Hammerschlag M.R., Alpert S., Rosner I. Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics*. **62** 57–62 (1978)
24. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M. L., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L. J., Xu C.: Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil. Steril.* **100**, 1261–1269 (2013)
25. Javurek, A.B., Spollen W.G., Ali A.M., Johnson S.A., Lubahn D.B., Bivens N.J., Bromert K.H., Ellersieck M.R., Givan, S.A., Rosenfeld C.S.: Discovery of a novel seminal fluid microbiome and influence of estrogen receptor alpha genetic status. *Sci. Rep.* **6**, 23027 (2016)
26. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G. R., Giwercman B. A., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. „Rekomendacje dotyczące postępowania w męskiej niepłodności", *Post. Androl.* **3**, 17–54 (2016)
27. Kacerovsky M., Vrbacky F., Kutova R., Pliskova L., Andrys C., Musilova I., Menon R., Lamont R., Nekvindova J.: Cervical microbiota in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One*, **10**, e0126884 (2015)
28. Karaoğlu Ş.: Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal *Lactobacilli*. *Turk. J. Med. Sci.* **33**, 7–13 (2003)
29. Koedooder R., Laven J.S.E. i wsp.: The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum. Reprod*. **34**, 1042–1054 (2019)
30. Koedooder R., Mackens S., Budding A., Fares D., Blockeel C., Laven J., Schoenmakers S.: Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum. Reprod*. **25**, 298–325 (2019)
31. Kong Y., Liu Z., Shang Q., Gao Y., Li X., Zheng C., Deng X., Chen T.: The disordered vaginal microbiota is a potential indicator for a higher failure of invitro fertilization. *Front. Med*. **7**, 217 (2020)
32. Kyono K., Hashimoto T., Kikuchi S., Nagai Y., Sakuraba Y.: A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium. *Reprod. Med. Biol.* **18**, 72–82 (2018)
33. Lundy S., Eng C.: Functional and taxonomic dysbiosis of the gut, urine, and semen microbiome in male infertility. *Fert. Steril.* **114**, e94 (2020)
34. Łepecka-Klusek C., Pilewska-Kozak A.B., Jakiel G.: Niepłodność w świetle definicji choroby podanej przez WHO, *Med. Og. Nauk. Zdr*. **18**, 163–166 (2012)
35. Łukaszuk K., Wołczyński S. i wsp.: (2018) Diagnostyka i leczenie niepłodności – rekomendacje Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRiE) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników (PTGP). *GiPP*, **3**, 112–140 (2018)
36. Macura B., Majewska-Szczepanik M., Strzępa A., Szczepanik M.: Wpływ mikrobioty macicy na zdrowie kobiety i jej potomstwa. *Med. Og. Nauk. Zdr*. **26**, 230–239 (2020)
37. Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res*. **69**, 32–41 (2013)
38. Mändar R., Truu J. i wsp.: Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Res. Microbiol.* **166**, 440–447 (2015)
39. Mändar R., Türk S., Korrovits P., Ausmees K., Punab M.: Impact of sexual debut on culturable human seminal microbiota. *Andrology*, **6**, 510–512 (2018)
40. Moreno I., Garcia-Grau I., Bau D., Perez-Villaroya D., Gonzalez--Monfort M., Vilella F., Romero R., Simón C.: The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **222**, 296–305 (2020)
41. Moreno, I.; Simon, C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertil. Steril.* **110**, 337–343 (2018)
42. Moreno I., Simon C.: Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction. *Reprod. Med. Biol.* **18**, 40–50 (2018)
43. Nardini P., Ñahui Palomino R.A., Parolin C., Laghi L., Foschi C., Cevenini R., Vitali B., Marangoni A.: *Lactobacillus* crispatus inhibits the infectivity of Chlamydiatrachomatis elementary bodies, in vitro study. *Sci. Rep*. **6**, 29024 (2016)
44. Nunn K.L., Forney L.J.: Unraveling the dynamics of the human vaginal microbiome. *Yale J. Biol. Med.* **9**, 331–337 (2016)
45. Nuriel-Ohayon M., Neuman H., Koren O.: Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front. Microbiol*. **7**, 1031 (2016)
46. Osadchiy V., Mills J. N., Mayer E. A., Eleswarapu S. V.: The seminal microbiome and male factor infertility. *Curr. Sex. Health Rep.* **12**, 202–207 (2020)
47. Petricevic L., Domig K.J., Nierscher F.J., Sandhofer M.J., Fidesser M., Krondorfer I., Husslein P., Kneifel W., Kiss H.: Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. *Sci. Rep.* **4**, 5136 (2014)
48. Petrova M.I., Lievens E., Malik S., Imholz N., Lebeer S.: *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol.* **6**, 81 (2015)
49. Petrova M.I., Reid G., Vaneechoutte M., Lebeer S.: *Lactobacillus* iners: Friend or Foe? *Trends Microbiol.* **25**, 182–191 (2017)
50. Pytka M., Kordowska-Wiater M., Jarocki P.: Mikrobiom układu płciowego kobiet. *Post. Mikrobiol.* **58**, 227–236 (2019)
51. Ravel J., Forney LJ. i wsp.: Vaginal microbiome of reproductive--age women. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4680–4687 (2011)
52. Schoenmakers S., Laven J.: The vaginal microbiome as a tool to predict IVF success. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **32**, 169–178 (2020)
53. Singer M., Borg M., Ouburg S., Morré S.A.: The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment-A meta-analysis. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod*. **48**, 223–229 (2019)
54. Stone L.: Infection: Vaginal microbiota and infectious infertility. *Nat Rev Urol.* **15**, 136 (2018)
55. Štšepetova J.A., Mändar R.: The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **18**, 3 (2020)
56. Swanson G.M., Moskovtsev S., Librach C., Pilsner J.R., Goodrich R., Stephen A., Krawetz S.A.: What human sperm RNA-Seq tells us about the microbiome. *J. Assist. Reprod. Genet.* **37**, 359–368 (2020)
57. Tachedjian G., O'Hanlon D.E., Ravel J.: The implausible „in vivo" role of hydrogen peroxide as an antimicrobial factor produced by vaginal microbiota. *Microbiome*, **6**, 29 (2018)
58. Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariati F., D'Argenio V.: Microbiota and human reproduction: the case of female infertility. *High Throughput*, **9**, 12 (2020)
59. Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariati F., D'Argenio V.: Microbiota and human reproduction: the case of male infertility. *High Throughput*, **9**, 10 (2020)
60. Valcarce D.G., Genovés S., Riesco M.F., Martorell P., Herráez M.P., Ramón D., Robles V.: Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic human donors. *Benef. Microbes*, **8**, 193–206 (2017)
61. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M.S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P.: Role of *Lactobacilli*

and *Lactoferrin* in the Mucosal Cervicovaginal Defense. *Front. Immunol.* **9,** 376 (2018)
62. Vallor A.C., Antonio M.A., Hawes S.E., Hillier S.L.: Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal *Lactobacilli*: role of hydrogen peroxide production. *J. Infect. Dis.* **184**, 1431–1436 (2001)
63. Verstraelen H., Vilchez-Vargas R., Desimpel F., Jauregui R., Vankeirsbilck N., Weyers S., Verhelst R., De Sutter P., Pieper D.H., Van De Wiele T.: Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *Peer J.* **4,** e1602 (2016)
64. Wang H., Chen T., Chen Y., Luo T., Tan B., Chen H., Xin H.: Evaluation of the inhibitory effects of vaginal microorganisms on sperm motility invitro. *Exp. Ther. Med*. **19,** 535–544 (2020)
65. Wee, B.A., Huston W.M. i wsp.: A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *J. Obstet. Gynaecol.* **58**, 341–348 (2018)
66. Weng S.L., Huang H.D. i wsp.: Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. **9**, e110152 (2014)
67. Witkin S.S., Linhares I.M.: Why do Lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG*, **124**, 606–611 (2017)
68. Zheng J., Lebeer S.A. i wsp.: Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **70**, 2782–2858 (2020)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 161–172
DOI: 10.21307/PM-2021.60.2.13

FITOTERAPIA W PROFILAKTYCE I WSPOMAGANIU LECZENIA ZAKAŻEŃ *HELICOBACTER PYLORI*

Małgorzata Siwińska[1]*, Martyna Mucha[1], Agata Pyrzanowska[2], Michał Szlaur[1]

[1] Pracownia Mikrobiologii Ogólnej, Katedra Biologii Bakterii, Uniwersytet Łódzki
[2] Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w czerwcu 2020 r., zaakceptowano w marcu 2021 r.

Streszczenie: *Helicobacter pylori* to Gram-ujemna pałeczka, mająca zdolność do kolonizacji odźwiernika żołądka. Szacuje się, że nawet ponad połowa światowej populacji może być nosicielem tego patogenu. Dane dotyczące zakażeń nie są dokładne, ponieważ objawy infekcji *H. pylori* występują jedynie u 20% zakażonych osób. Obecność bakterii może prowadzić do stanu zapalnego, wrzodów oraz nowotworu żołądka. W przypadku stwierdzenia zakażenia najczęściej stosuje się potrójną terapię inhibitorem pompy protonowej oraz antybiotykami. Obserwowany jest jednak coraz niższy wskaźnik skuteczności tej terapii z uwagi na nabieranie oporności przez bakterie na wykorzystywane w leczeniu antybiotyki. Poszukiwane są nowe rozwiązania, które mogłyby zarówno wspomóc leczenie zakażeń wywołanych przez *H. pylori*, jak i działałyby profilaktycznie, zapobiegając rozprzestrzenianiu patogenu. Jedną z form wspomagających leczenie różnego rodzaju infekcji, co potwierdzają liczne badania naukowe, jest zastosowanie preparatów roślinnych. Fitoterapia to nauka, wykorzystująca wiedzę o naturalnie występujących w roślinach związkach aktywnych, opierająca się na zastosowaniu produktów roślinnych w celu poprawy stanu zdrowia. Z dostępnych badań wynika, że spożywanie niektórych produktów pochodzenia roślinnego np. oliwy z oliwek czy zielonej herbaty może doprowadzić do eradykacji *H. pylori.* Lukrecja natomiast może być wykorzystywana wspomagająco przy zastosowaniu klasycznej metody leczenia, zwiększając tym samym współczynnik eradykacji patogenu. Roślinami o właściwościach anty-*H. pylori* są również cynamonowiec, żurawina, oregano, aloes i inne. Celem niniejszej pracy jest przegląd literatury, przedstawiającej możliwości wykorzystania fitoterapii w zwalczaniu, wspomaganiu leczenia lub profilaktyce zakażeń powodowanych przez *H. pylori.*

1. Wprowadzenie – charakterystyka *H. pylori*. 2. Wybrane rośliny w zapobieganiu i eradykacji zakażeń *H. pylori.* 2.1. *Citrus* spp. (owoce cytrusowe). 2.2. *Allium sativum* (czosnek). 2.3. *Brassica oleracea* var. *italica* (brokuły). 2.4. *Vaccinium macrocarpon* (żurawina wielkowocowa). 2.5. *Camellia sinensis* (zielona herbata). 2.6. *Olea europaea* (oliwka europejska). 2.7. *Cinnamomum verum* (cynamonowiec cejloński). 2.8. *Aloe vera* (aloes zwyczajny). 2.9. *Glycyrrhiza glabra* Linn. (lukrecja). 2.10. *Curcuma longa* (kurkumina). 2.11. *Bryophyllum pinnatum* (żyworódka pierzasta). 2.12. Olejki eteryczne. 2.13. Inne rośliny o aktywności anty-*H. pylori*. 3. Podsumowanie

PHYTOTHERAPY IN THE PREVENTION AND SUPPORT OF TREATMENT OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTIONS

Abstract: *Helicobacter pylori* is a Gram-negative, rod-shaped bacterium with an ability to colonise the gastric pylorus. It is estimated that more than half of the human population may be carriers of this pathogen. Unfortunately, the collected data concerning *H. pylori* infections is inaccurate as the symptoms occur only in 20% of people infected. The presence of the bacteria may lead to inflammation, stomach ulcers, or even cancer. In the cases of confirmed infection, the treatment usually involves a so called "triple therapy" with a proton-pump inhibitor and antibiotics. However, a decrease in the effectiveness of this therapy is observed as a result of increasing antibiotic resistance in bacteria. New solutions are being researched that could both help in the treatment of *H. pylori* infections and prevent the spread of the pathogen. Numerous scientific studies confirm that the use of plant-based products can be a good addition to the treatment of various infections. Phytotherapy is a science-based medical practice that uses the knowledge about active compounds naturally occurring in plants, in order to improve overall health. From existing research, it is known that the consumption of certain plant-derived products, for example olive oil and green tea, can lead to *H. pylori* eradication. On the other hand, licorice can be used to support the classic treatment method by increasing the eradication rate of the pathogen. Plants with anti-*H. pylori* properties include: cinnamon, cranberry, oregano, aloe vera and many others. The aim of this work is to review literature that is focused on a potential use of phytotherapy to support the treatment, combat, or prevent infections caused by *H. pylori*.

1. Introduction – characteristics of *H. pylori*. 2. Selected plants in the prevention and eradication of *H. pylori* infections. 2.1. *Citrus* spp. (citrus fruits). 2.2. *Allium sativum* (garlic). 2.3. *Brassica oleracea* var. *italica* (broccoli). 2.4. *Vaccinium macrocarpon* (cranberry). 2.5. *Camellia sinensis* (green tea). 2.6. *Olea europaea*. 2.7. *Cinnamomum verum*. 2.8. *Aloe vera*. 2.9. *Glycyrrhiza glabra* Linn (licorice). 2.10. *Curcuma longa* (curcumin). 2.11. *Bryophyllum pinnatum*. 2.12. Essential oils. 2.13. Anti-*H. pylori* activity of other plants. 3. Summary

Słowa kluczowe: fitoterapia, roślinne substancje czynne, infekcje *Helicobacter pylori*
Keywords: phytotherapy, plant active substances, *Helicobacter pylori* infections

* Autor korespondencyjny: Małgorzata Siwińska, Pracownia Mikrobiologii Ogólnej, Katedra Biologii Bakterii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel. 42 635 44 69; e-mail: malgorzata.siwinska@biol.uni.lodz.pl

1. Wprowadzenie – charakterystyka *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori to Gram-ujemna bakteria, występująca głównie w formie spiralnej pałeczki o helikalnym skręcie w kształcie litery S lub U, która może osiągać 5 μm długości i od 0,5 do 1 μm szerokości. Posiada, umożliwiające poruszanie się, umieszczone horyzontalnie rzęski (zazwyczaj w liczbie od czterech do sześciu). Optymalne warunki wzrostu *Helicobacter* sp. to środowisko mikroaerofilne, przy zwiększonej prężności dwutlenku węgla i jednocześnie obniżonej tlenu, w temperaturze 36–42°C przy wartości pH 5–7 [20, 25, 43, 54]. Szacuje się, że połowa ludzkości na świecie jest nosicielem tej bakterii [5, 25, 42, 56]. Do rozwoju infekcji, które powoduje, znacznie częściej dochodzi u mieszkańców krajów rozwijających się, w porównaniu do krajów rozwiniętych, na co wpływa status społeczno-gospodarczy, warunki sanitarno-higieniczne oraz poziom edukacji [61]. Wskaźnik zakażeń wywołanych przez *H. pylori* oscyluje na poziomie 85–95% w krajach rozwijających się i 30–50% w krajach rozwiniętych [5]. Do zakażenia *H. pylori* może dojść na drodze gastryczno-oralnej (poprzez kontakt z wymiocinami), fekalno-oralnej (poprzez kontakt z kałem) oraz oralno-oralnej (poprzez pocałunki, pokarm czy kontakt ze śliną osoby chorej) [1, 20, 41]. Źródłem przenoszenia bakterii i rozprzestrzeniania się infekcji może być również skażona patogenem woda [41, 54].

H. pylori najczęściej kolonizuje odźwiernik żołądka człowieka, ale może również bytować w przełyku i dwunastnicy, płytce nazębnej oraz w kale. Mikroorganizmy te mogą występować jako formy wolne i zawieszone w śluzie. Charakterystyczna dla nich jest również kolonizacja międzykomórkowa oraz adhezja powierzchniowa [20, 54]. U ponad 80% zakażonej populacji infekcja jest bezobjawowa, dochodzi do niej we wczesnym dzieciństwie i towarzyszy ona człowiekowi przez całe życie [43]. Niestety, u pozostałych 20% zakażonych osób, konsekwencją obecności *H. pylori* jest zapalenie błony śluzowej żołądka, choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy oraz nowotwór żołądka i chłoniak typu MALT (mucosa associated lumphoid tissue lymphoma) [1, 13, 20, 25, 29, 54]. Rak żołądka zajmuje drugie miejsce pod względem liczby zgonów, związanych z obecnością nowotworu oraz czwarte miejsce, biorąc pod uwagę częstość występowania w odniesieniu do wszystkich nowotworów na świecie. U ponad połowy chorych ma związek z obecnością *H. pylori*. Ryzyko rozwoju raka żołądka u osób zakażonych tą bakterią jest od dwóch do siedmiu razy większe niż u osób, u których nie zdiagnozowano jej obecności [41, 56]. W 1994 roku pałeczka *H. pylori* została zaklasyfikowana do pierwszej grupy czynników kancerogennych przez IARC (International Agency for Research on Cancer – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem) i uznana za pierwotny czynnik = rozwoju raka żołądka [5, 25, 41, 43, 56]. W ostatnich latach wykazano, że zakażenie *H. pylori* ma również związek ze schorzeniami pozajelitowymi, takimi jak niedokrwistość, choroby sercowo-naczyniowe, cukrzyca i inne [13, 43].

Unikalne zdolności metaboliczne *H. pylori*, umiejętność unikania odpowiedzi immunologicznej człowieka oraz wytwarzanie czynników wirulencji odgrywają ogromną rolę w patogenezie chorób, spowodowanych obecnością tego patogenu [20, 25]. Drobnoustrój ten posiada na powierzchni komórki warstwę glikokaliksu, której obecność determinuje ujemny ładunek komórki oraz wpływa na hydrofobowość bakterii. Charakterystyczna dla tego mikroorganizmu jest też unikalna zdolność glikozylacji cholesterolu i przyłączania go do własnej błony zewnętrznej, co stanowi dla bakterii ochronę przed stresem środowiskowym [5, 20, 52, 54].

Czynniki chorobotwórczości, dzięki którym bakterie mogą kolonizować, namnażać się oraz przeżyć, nawet w niekorzystnym dla nich środowisku, możemy podzielić na trzy grupy:

- czynniki odpowiadające za kolonizację:
  - produkcja ureazy, rozkładającej mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla i warunkującej przetrwanie w niskim pH żołądka [1, 5, 14, 20, 25, 29, 41, 43, 54, 56],
  - adhezja komórek *H. pylori* do komórek nabłonka żołądka – główną adhezyną jest białko zlokalizowane w błonie zewnętrznej drobnoustroju – BabA (blood group antigen binding adhesin A), które rozpoznaje na komórkach gospodarza antygeny grupy krwi B w układzie Lewisa oraz determinuje gęstość kolonizacji [1, 5, 11, 25, 29, 41, 43, 56],
  - obecność rzęsek i spiralny kształt komórki, umożliwiające poruszanie się w śluzie [1, 5, 20, 41, 56],
- czynniki odpowiadające za przetrwanie drobnoustroju, oporność na fagocytozę i mechanizmy humoralnej odpowiedzi gospodarza: enzymy – dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, ureaza i inne [5, 11, 54, 56],
- czynniki oddziałujące toksycznie na błonę śluzową żołądka:
  - lipopolisacharyd (LPS), którego budowa (lipid A LPS) wpływa na niższą aktywność prozapalną niż LPS innych patogennych szczepów, ograniczając oddziaływanie LPS *H. pylori* z immunoreceptorami obecnymi na powierzchni komórek gospodarza, co powoduje częste przechodzenie infekcji w stan przewlekły [2, 41, 56],
  - cytotoksyna wakuolizująca A – VacA (vacuolating cytotoxin A), której wytwarzanie prowadzi do uszkodzenia komórek nabłonkowych poprzez tworzenie wakuoli, co wpływa na wzrost przepuszczalności, zmiany w obrębie cytoszkieletu i indu-

kuje zjawisko apoptozy [1, 11, 14, 25, 29, 41, 43, 56],
- wytwarzany z mocznika na skutek działania bakteryjnej ureazy amoniak [1, 14, 20, 25, 29, 41, 43, 54, 56],
- wyspa patogenności cag-PAI (cag pathogenicity island), w skład której wchodzi m.in. gen *cagA* (cytotoxin associated gene), którego produktem jest silnie immunogenne białko CagA (cytotoxin associated protein A), [1, 11, 14, 25, 41, 43, 56].

Wybrane czynniki wirulencji *H. pylori* i ich rola w przebiegu infekcji zostały zestawione w tabeli I.

Poza szeregiem czynników zjadliwości, umożliwiających *H. pylori* adhezję oraz przetrwanie w niesprzyjających warunkach, jakie panują w żołądku, drobnoustrój ten w swojej patogenezie wykorzystuje strategię mimikry molekularnej. Jest to zjawisko, umożliwiające zaadaptowanie się bakterii do organizmu gospodarza i uniknięcie jego mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Mimikra molekularna związana jest z antygenowym i funkcjonalnym podobieństwem pomiędzy strukturą drobnoustroju, a składnikami komórek gospodarza [5, 7, 13]. Zidentyfikowano wiele sekwencji homologicznych pomiędzy antygenami *H. pylori*, a polipeptydami wchodzącymi w skład komórek gospodarza. Przeciwciała skierowane przeciwko białkom bakteryjnym (np. białko VacA czy ureaza) mogą reagować z receptorami obecnymi na komórkach. Wykazano podobieństwo ureazy bakteryjnej (regionu podjednostki UreB) do ludzkiego białka CCRL1 (CC-chemokine receptor-like 1) w tkance serca, co może sugerować związek pomiędzy przewlekłym zakażeniem *H. pylori,* a zmianami miażdżycowymi. U większości osób z rozpoznanym autoimmunologicznym zapaleniem trzustki wykrywane są natomiast przeciwciała przeciwko PBP (plasminogen binding protein – białko wiążące plazminogen) *H. pylori*, które wykazuje homologię z enzymem (ligaza ubikwitynowa), produkowanym przez komórki trzustki [13]. W przypadku *H. pylori* istotną rolę w występowaniu zjawiska mimikry molekularnej odgrywa LPS. W strukturze O-swoistej LPS wielu szczepów *H. pylori* zidentyfikowano takie same wielocukry, jak w ludzkich antygenach Lewis^{a}, Lewis^{b}, sialo-Lewis^{x} oraz sialo-Lewis^{y}, a także w antygenach systemu grupowego krwi AB0. Dzięki temu podobieństwu możliwe jest unikanie odpowiedzi odpornościowej ze strony gospodarza, co prowadzi do zajęcia komórek błony śluzowej żołądka przez drobnoustrój [2, 5]. Ponadto podobieństwo strukturalne LPS do ludzkich antygenów Lewisa może prowadzić do produkcji autoprzeciwciał, indukowanej przez patogen u pacjentów zakażonych *H. pylori*. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom Lewisa mogą wiązać się zarówno z częścią O-swoistą LPS *H. pylori*, jak również z antygenami Lewisa obecnymi na ludzkich leukocytach, komórkach nabłonka żołądka oraz komórkach śródbłonka. Podobieństwo bakteryjnego LPS do ludzkich antygenów Lewisa sprzyja adaptacji bakterii do błony śluzowej żołądka gospodarza, pozwala

Tabela I
Wybrane czynniki chorobotwórczości *H. pylori* i ich rola w przebiegu infekcji

Czynnik chorobotwórczości	Funkcja	Piśmiennictwo
Ureaza	Przetrwanie w kwaśnym środowisku żołądka	[1, 5, 14, 20, 25, 29, 41, 43, 54, 56]
Białka adhezyjne (BabA, SabA, OipA, HopQ i inne)	Przyleganie do komórek nabłonkowych żołądka	[1, 5, 11, 25, 29, 41, 43, 56]
Rzęski, spiralny kształt i system chemotaksji	Ukierunkowany ruch, ułatwienie poruszania się w śluzie	[1, 5, 20, 41, 56]
Cytotoksyna wakuolizująca – VacA	Efekt cytotoksyczny, wakuolizacja i uszkodzenie komórek nabłonkowych żołądka, zwiększenie adhezji bakterii do komórek żołądka, blokowanie odpowiedzi limfocytów T	[1, 5, 11, 14, 25, 29, 41, 43, 56]
Białko CagA	Onkoproteina o aktywności proapoptycznej, wpływ na nieprawidłową proliferację i zahamowanie adhezji pomiędzy komórkami nabłonkowymi	[1, 11, 14, 25, 29, 41, 43, 56]
Wyspa patogenności cag-PAI, system sekrecji typu IV (TFSS – type four secretion system)	Transport białka CagA i innych składników komórki bakterii za pośrednictwem TFSS do komórek nabłonkowych żołądka, wytwarzanie IL-8, prowadzące do rozwoju procesu zapalnego	[1, 5, 11, 14, 25, 41, 43, 56]
Dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza	Ochrona przed szkodliwym działaniem aktywnych form tlenu	[5, 11, 54, 56]
Fosfolipazy (A, A1, A2, C, D)	Trawienie fosfolipidów w błonie nabłonkowej żołądka, stymulacja przewlekłego zapalenia, wpływ na powstawanie biologicznie aktywnych związków (lizofosfolipidów i kwasu arachidonowego – prekursora leukotrienów i prostaglandyn)	[5, 54, 56]
Lipopolisacharyd (LPS) o niskiej aktywności prozapalnej	Zwiększona przeżywalność, uwarunkowana słabszą reakcją układu odpornościowego na LPS	[2, 41, 56]
Mimikra molekularna	Maskowanie antygenów bakteryjnych	[2, 7, 13]

uniknąć mechanizmów odpowiedzi immunologicznej oraz umożliwia niszczenie tkanek gospodarza poprzez indukowanie produkcji autoprzeciwciał anty-Lewis [13]. Zatem wykorzystanie mimikry molekularnej przez *H. pylori* moduluje odpowiedź odpornościową gospodarza poprzez jej wyciszenie, dzięki czemu drobnoustrój z sukcesem kolonizuje błonę śluzową żołądka, wywołując przewlekły stan zapalny, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Podkreślany jest również związek pomiędzy zakażeniem *H. pylori*, a autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy, czy cukrzycą typu 1 oraz wieloma innymi chorobami o charakterze przewlekłym, co ściśle wiąże się ze strategią mimikry molekularnej *H. pylori* [7, 13].

Klasyczna droga leczenia zakażenia *H. pylori* to potrójna terapia, w której wykorzystuje się inhibitor pompy protonowej (PPI – proton pump inhibitors) oraz antybiotyki: klarytromycynę, amoksycylinę lub metronizadol [6, 41, 56]. Wskaźnik wyleczenia i eliminacji tego drobnoustroju przy zastosowaniu proponowanego schematu leczenia, który wprowadzony został w 1997 roku, początkowo wynosił 90%, a aktualnie jest na poziomie 75% i nadal spada [41]. Wynika to z faktu, że opisywany drobnoustrój coraz częściej wykazuje oporność na wykorzystywane w terapii antybiotyki [6, 56]. Należy również wspomnieć o występujących dość często objawach niepożądanych, które towarzyszą temu schematowi leczenia. Należą do nich nudności, wymioty, biegunka oraz ból żołądka [46]. Eradykacja *H. pylori* ma na celu nie tylko zahamowanie i zmniejszenie zapadalności na raka żołądka, ale także obniżenie zachorowalności na inne choroby, które mają związek z obecnością tego patogenu [7, 13, 43].

Biorąc pod uwagę częstość występowania zakażeń, wpływ społeczno-ekonomiczny na ich liczbę oraz wciąż rosnącą oporność patogenu na antybiotyki, warto zwrócić uwagę na możliwość stosowania substancji pochodzenia naturalnego w leczeniu infekcji, powodowanych przez *H. pylori* [25]. Metabolity wtórne produkowane przez rośliny znalazły zastosowanie w profilaktyce oraz eradykacji wielu zakażeń o podłożu bakteryjnym, wirusowym czy grzybiczym. Liczne badania donoszą o występowaniu w tkankach roślinnych substancji aktywnych działających anty-*H. pylori* [41, 45, 51, 56]. Stosunkowo nieliczne są natomiast doniesienia o mechanizmie ich działania, obejmującym głównie: zahamowanie syntezy toksyny VacA, białka CagA, a także aktywności ureazy wytwarzanej przez drobnoustrój, uszkodzenie DNA bakterii i wpływ na zablokowanie zjawiska adhezji, które jest kluczowym elementem rozwoju zakażenia [43, 56]. Oczekiwany efekt terapeutyczny może być również związany m.in. z obniżoną odpowiedzią ze strony układu odpornościowego gospodarza [29].

2. Wybrane substancje roślinne w zapobieganiu i eradykacji zakażeń *H. pylori*

Poniżej omówiono zastosowanie wybranych roślin i występujących w nich substancji czynnych, których wpływ na eradykację zakażeń *H. pylori* poddany został badaniom, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Aktywność przeciw *H. pylori* wykazują owoce cytrusowe (*Citrus* spp.), czosnek (*Allium sativum*), brokuły (*Brassica oleracea* var. *italica)*, żurawina (*Vaccinium macrocarpon*), zielona herbata (*Camellia sinensis*), oliwka europejska (*Olea europaea*), cynamonowiec cejloński (*Cinnamomum verum*), aloes zwyczajny (*Aloe vera*), lukrecja (*Glycyrrhiza glabra* Linn.), kurkumina (*Curcuma longa*), żyworódka pierzasta (*Bryophyllum pinnatum*), a także olejki pozyskane m.in. z tymianku (*Thymus vulgaris*), oregano (*Origanum vulgare*) i wielu innych roślin. Bardzo często za przeciwdrobnoustrojowe działanie tych roślin odpowiadają obecne w nich polifenole, a wśród nich m.in. flawony, flawonoidy, antocyjanidyny oraz kwasy fenolowe. W tabeli II podano przykłady roślin, zawartych w nich substancji aktywnych wraz z mechanizmem działania anty-*H. pylori*.

2.1. *Citrus* spp. (owoce cytrusowe)

Dostępne są liczne doniesienia na temat wpływu owoców cytrusowych na hamowanie rozwoju zakażenia powodowanego przez *H. pylori* [18, 34, 47, 50]. Ekstrakty z *Citrus aurantifolia* i *Citrus aurantium* wykazują bardzo silne właściwości inhibicyjne w stosunku do bakteryjnej ureazy, a wartość MIC (minimum inhibitory concentration) wynosi odpowiednio 432 μg/ml oraz 465 μg/ml [34]. Mandalari i wsp. [34] donoszą również o działaniu gastroprotekcyjnym i eradykacji pałeczki po zastosowaniu olejku eterycznego z *Citrus lemon*, co związane jest z zawartością limonenu i β-pinenu, których wartości MIC określono na 125 μg/ml oraz 75 μg/ml. W badaniach przeprowadzonych przez Filocamo i wsp. [18] na dwóch wzorcowych oraz 32 izolatach klinicznych *H. pylori,* zaobserwowano efekt działania ekstraktu uzyskanego z endemicznej rośliny, pochodzącej z południowych Włoch, *Citrus bergamia* (BJ), zarówno po zastosowaniu samego wyciągu roślinnego, jak i w połączeniu z antybiotykami. Wzrost połowy izolatów klinicznych został zahamowany przy użyciu 2,5% BJ, natomiast BJ w stężeniu 5% zahamował wzrost aż 90% badanych szczepów. Stosując BJ w połączeniu z amoksycyliną, klarytromycyną oraz metronidazolem uzyskano najsilniejszy efekt inhibicyjny. Udowodniono również, że szczepy *H. pylori* CagA-ujemne w porównaniu do CagA-dodatnich są bardziej podatne na działanie BJ. Mechanizm synergistycznego działania antybiotyków w połączeniu z ekstraktem z *C. bergamia*

Tabela II
Wybrane substancje roślinne i mechanizm ich działania przeciwko *Helicobacter pylori*

Roślina	Substancja czynna	Mechanizm działania
Citrus bergamia, *C. aurantifolia*, *C. aurantium* (owoce cytrusowe)	neohesperydyna, hespertyna, neoeriocitrin, eriodictyol, naringina, naringenina aurapten	zaburzenie ciągłości błony fosfolipidowej bakterii [18], wpływ na zmniejszenie ekspresji genu odpowiedzialnego za produkcję ureazy, ograniczenie produkcji mediatorów prozapalnych [47, 50]
Allium sativum (czosnek)	allicyna	zablokowanie syntezy azotu, usuwanie azotanów oraz wolnych rodników [62]
Brassica oleracea var. *italica* (brokuł)	sulforafan izotiocyjaniny	stymulacja aktywności enzymów przeciwutleniających, ochrona komórek przed stresem oksydacyjnym [60]
Vaccinium macrocarpon (żurawina)	oligosacharydy, flawony, poliflan-3-ol, głównie proantocyjanidyny typu A	zahamowanie adhezji bakterii do ścian żołądka [35]
Camellia sinensis (zielona herbata)	galusan epigallokatechiny i galusan epikatechiny	zachowanie integralności błony śluzowej żołądka, zahamowanie aktywności ureazy i białka VacA bakterii [29, 59]
Cinnamomum verum (cynamonowiec cejloński)	aldehyd cynamonowy	hamowanie aktywności ureazy, blokowanie szlaku NF-κB, co wpływa przeciwzapalnie na komórki żołądka [37]
Aloe vera (aloes zwyczajny)	pochodne antrachinonów, aloeemodyna, chryzofanol, fiscjon, emodyna oraz reina	zablokowanie adhezji drobnoustrojów do komórek żołądka [15]
Curcuma longa (kurkumina)	diferoloilometan (polifenole)	hamowanie wydzielania przez komórki żołądka metaloproteinazy 3 i 9, a tym samym powstawania wrzodów i raka żołądka [55]
Bryophyllum pinnatum (żyworódka pierzasta)	flawonoidy, alkaloidy, fenole, glikozydy	działanie jako przeciwutleniacz, ochrona błony śluzowej żołądka przed reaktywnymi formami tlenu [28]

polega prawdopodobnie na uszkodzeniu błony fosfolipidowej bakterii przez związek roślinny, co skutkuje zwiększeniem przepuszczalności dla leku i w efekcie zahamowaniem wzrostu drobnoustroju. Substancje aktywne w badanym soku to polifenole: neohesperydyna, hespertyna, neoeriocitrin, eriodictyol, naringina oraz naringenina. Takeda i wsp. [50] wykazali wpływ cytrusowej pochodnej kumaryny, w której występuje związek o właściwościach antyoksydacyjnych – aurapten (eter monoterpenowo-kumarynowy) na zmniejszenie stopnia kolonizacji żołądka myszoskoczków mongolskich (*Meriones unguiculatus*) przez *H. pylori*. W tym celu zwierzęta zakażono, a następnie przez 7 tygodni podawano im 100 lub 500 ppm auraptenu, który miał inhibicyjny wpływ na ekspresję genu odpowiedzialnego za produkcję ureazy, co z kolei skutkowało zahamowaniem kolonizacji żołądka. Substancja ta nie wykazała jednak właściwości łagodzących zapalenie żołądka. Takeda i wsp. [50] sugerują, że może mieć to związek ze zbyt krótkim czasem trwania badania, ponieważ z przeprowadzonych wcześniej badań *in vitro* wynika, że aurapten może łagodzić nieżyt żołądka i wykazywać działanie przeciwnowotworowe. Działanie tego związku opiera się na ograniczeniu produkcji mediatorów prozapalnych oraz ekspresji receptora CD74, który jest cząsteczką adhezyjną dla bakteryjnej ureazy. Inhibitory receptora CD74 mogą być doskonałymi kandydatami, hamującymi adhezję bakterii do błony śluzowej żołądka, co jest niezwykle ważnym elementem warunkującym rozwój zakażenia. Związkiem, który również wykazuje taką zdolność jest bergamotyna (furanokumaryna), wskazywana jako najlepszy pretendent w leczeniu infekcji powodowanych przez *H. pylori* [47].

2.2. *Allium sativum* (czosnek)

Właściwościami bakteriobójczymi oraz bakteriostatycznymi, wykorzystywanymi w leczeniu infekcji, powodowanymi przez różne gatunki drobnoustrojów, charakteryzuje się również czosnek (*Allium sativum*). Substancje aktywne, które się w nim znajdują to m.in. związki siarki czy kwasy organiczne, jednakże działanie przeciwdrobnoustrojowe przypisuje się głównie allicynie oraz olejowi czosnkowemu [4, 62]. Prowadzone badania *in vitro,* mające na celu zbadanie wpływu czosnku na przebieg infekcji *H. pylori,* dawały niejednoznaczne rezultaty. Wyniki uzyskane po przeprowadzeniu badań na 15 klinicznych i jednym wzorcowym izolacie wykazały, że czosnek wykazuje w warunkach *in vitro* właściwości hamujące wzrost *H. pylori*, ale są one stosunkowo słabe. MIC dla ekstraktu z suszonych cebulek czosnku wynosił ponad 100 μg/ml. Bardziej obiecujące wyniki uzyskano w próbie z wykorzystaniem allicyny, gdzie MIC50, jak i MIC90 dla tej substancji wynosił 25 μg/ml [33]. W badaniu *in vivo*

na myszkoskoczkach mongolskich (*Meriones unguiculatus*) z zapaleniem żołądka spowodowanym przez *H. pylori*, sprawdzano działanie 4% ekstraktu oleju czosnkowego podczas sześciotygodniowej terapii. Po zakończeniu doświadczenia zaobserwowano zmniejszenie stopnia zapalenia żołądka, przy jednoczesnym braku znacznych zmian w samym zahamowaniu infekcji [23]. Sprawdzano również wpływ czosnku na zakażenie *H. pylori* u 15 pacjentów, wykorzystując ureazowy test oddechowy i wykazano, że spożywanie świeżego czosnku hamuje aktywność *H. pylori* w błonie śluzowej żołądka [62]. Inni badacze donoszą, że podawanie oleju czosnkowego po posiłku lub na czczo może mieć wpływ na eliminację bakterii [51]. Wyniki doświadczeń trwających ponad 14 lat z wykorzystaniem mieszaniny ekstraktu czosnku i destylowanego oleju czosnkowego wykazały jednak, że długotrwała suplementacja czosnkiem nie ma statystycznie istotnego wpływu na spadek zapadalności i umieralności na raka żołądka [32].

2.3. *Brassica oleracea* var. *italica* (brokuły)

Właściwości przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe oraz przeciwbakteryjne przypisuje się również brokułom. Najsilniejszym związkiem aktywnym występującym w ich kiełkach jest sulforafan izotiocyjaniny (SF) [12, 16, 60]. W badaniu przeprowadzonym na 48 szczepach *H. pylori* (trzech referencyjnych oraz 45 izolatach klinicznych) wykazano, że SF wykazuje działanie bakteriostatyczne, a MIC dla tego związku wynosi od 0,06 do 8 μg/ml (średnia 2,5 μg/ml) [16]. W badaniach *in vivo* z udziałem zarówno ludzi ze zdiagnozowaną infekcją, a także myszy zainfekowanych *H. pylori*, udowodniono pozytywny wpływ kiełków brokułów, bogatych w SF, na zahamowanie rozwoju zakażenia [60]. W modelu mysim po uprzednim zakażeniu, zwierzętom przez dwa miesiące podawano kiełki z wysoką zawartością SF oraz utrzymywano dietę bogatą w sól. Wykazano zmniejszenie stopnia kolonizacji żołądka przez *H. pylori*, złagodzenie stanu zapalnego oraz zahamowanie procesu nowotworzenia. W drugim modelu 48 ochotników przyjmowało doustnie 70 g kiełków brokułów przez osiem tygodni. Leczenie miało wpływ na obniżenie aktywności ureazy bakteryjnej, której poziom mierzono za pomocą ureazowego testu oddechowego. Jednak po dwóch miesiącach od zakończenia badania wyniki osób, biorących udział w doświadczeniu, powróciły do wartości sprzed leczenia. Uzyskane dane sugerują, że podawanie kiełków brokułów może prowadzić do zmniejszenia stopnia kolonizacji żołądka przez *H. pylori,* ale nie jest w stanie całkowicie wyeliminować obecności bakterii [60]. W innym badaniu, przeprowadzonym na osobach zakażonych *H. pylori*, którym podawano ekstrakt z kiełków brokułów zawierający SF przez cztery tygodnie, nie wykazano zahamowania wzrostu bakterii w błonie śluzowej żołądka. Autorzy sugerują jednak, że produkt ten może odgrywać rolę cytoochronną w zapaleniu żołądka, wywołanym przez *H. pylori* [12].

2.4. *Vaccinium macrocarpon* (żurawina wielkoowocowa)

Rośliną powszechnie kojarzoną przede wszystkim z zapobieganiem rozwojowi infekcji układu moczowego, co ma związek z hamowaniem przylegania bakterii do nabłonka dróg moczowych, a tym samym uniemożliwia rozwój choroby, jest żurawina, która znalazła również zastosowanie w leczeniu zakażeń, powodowanych przez *H. pylori.* Działanie przeciwadhezyjne żurawiny związane jest z obecnością poliflan-3-olów, głównie proantocyjanidyn typu A, ale także innych składników – oligosacharydów i flawonów [40]. W przeprowadzonym doświadczeniu Matsushima i wsp. [35] sprawdzali wpływ wyciągu z żurawiny na wzrost dwóch szczepów *H. pylori*. Wykazano, że ekstrakt ten w stężeniu 3,3 mg/ml jest w stanie prawie całkowicie zahamować wzrost *H. pylori* w warunkach *in vitro.* Działanie inhibicyjne zaobserwowano także przy użyciu soku z żurawiny, którego 2% stężenie odpowiadało 1 mg/ml ekstraktu. Wyniki dodatkowych badań, przeprowadzonych w celu identyfikacji substancji aktywnych, odpowiadających za obserwowany efekt, wyraźnie wskazywały na aktywność inhibicyjną polifenoli [35]. Lin i wsp. [31] badali wpływ działania żurawiny w zestawieniu z oregano na wzrost *H. pylori*. Najlepszy efekt osiągnięto, stosując ekstrakt, składający się w 25% z oregano i w 75% z żurawiny. Synergistyczne działanie ekstraktu nie tylko hamuje wzrost *H. pylori*, ale także wpływa na inhibicję ureazy. Autorzy sugerują, że fenole z oregano mogą działać na poziomie błony komórkowej, a następnie po zahamowaniu aktywności ureazy, fenole z żurawiny mogą wpływać na funkcje cytozolu [31, 55]. Inni badacze donoszą, że sam sok z żurawiny nie jest w stanie wyleczyć infekcji powodowanej przez *H. pylori*, a może jedynie wpływać na zmniejszenie liczby drobnoustrojów. W przeprowadzonym doświadczeniu podawano zakażonym myszom przez miesiąc sok z żurawiny i zaobserwowano zahamowanie wzrostu *H. pylori* w 80% przypadków przy wskaźniku eradykacji, który wyniósł 20% [57]. Innym badaniem objęto pacjentów ze zdiagnozowanym zakażeniem *H. pylori,* których podzielono na dwie grupy. Jedną poddano potrójnej terapii antybiotykami z lanzoprazolem, a drugą również potrójnej terapii antybiotykami i dodatkowo suplementacją żurawiną (500 mg) przez 14 dni. W grupie drugiej osiągnięto wskaźnik eradykacji *H. pylori* 89% i jest to wartość o 15% wyższa niż w grupie pierwszej [48].

2.5. *Camellia sinensis* (zielona herbata)

Zdolność inhibicji wytwarzania ureazy *H. pylori,* a także zahamowanie wakuolizacji komórek, będącej efektem aktywności białka VacA, produkowanego przez bakterie, wykazują natomiast zawarte w zielonej herbacie katechiny, czyli związki polifenolowe należące do flawonoidów [59]. W zielonej herbacie występuje głównie galusan epigallokatechiny (EGCg) oraz galusan epikatechiny (ECg), które stanowią odpowiednio 36% i 24% wszystkich katechin zielonej herbaty. Do badań wybrano 56 izolatów klinicznych *H. pylori*, z których 19 wykazywało wysoką oporność na metronidazol i/lub klarytromycynę. Szczepy podzielono na trzy grupy: wrażliwe na antybiotyki (amoksycylina (AMX), klarytromycyna (CLR) oraz metronidazol (MTZ)), oporne na CLR lub MTZ, oporne na CLR i MTZ i sprawdzano wpływ poszczególnych katechin na izolaty. Zarówno ECg jak i EGCg wykazały przeciwbakteryjne działanie przeciwko wszystkim, nawet opornym na antybiotyki szczepom. Określono MIC dla tych dwóch katechin na poziomie 100 μg/ml w stosunku do 90% badanych szczepów. Dodatkowo przeprowadzono badanie, w którym wykazano, że 1/8 MIC EGCg i 1/4 MIC AMX w stężeniu 12,5 μg/ml hamuje wzrost *H. pylori*, podczas gdy osobno te substancje w podanych stężeniach nie wykazują takiego działania [59]. Stoicov i wsp. [49] wykazali maksymalne działanie bakteriostatyczne po zmieszaniu trzech jednostek zielonej herbaty z jedną jednostką zawiesiny bakteryjnej. Wyniki tego badania sugerują, że nie tylko pojedyncze katechiny, ale również wprowadzenie do diety zielonej herbaty może zahamować kolonizację żołądka przez *H. pylori*. Wykazano również, że u myszy, którym podano przed zakażeniem *H. pylori* zieloną herbatę nie zaobserwowano rozwoju zapalenia śluzówki ściany żołądka. U zwierząt, którym podano herbatę po zakażeniu bakteriami, rozwinęło się łagodne (w porównaniu do grupy kontrolnej dodatniej) zapalenie podśluzówkowe i zapalenie błony śluzowej. Udowodniono również, że w tych dwóch przypadkach liczba badanych drobnoustrojów w żołądkach myszy była znacznie mniejsza w stosunku do dodatniej próby kontrolnej. W innym badaniu, również *in vivo,* przeprowadzonym przez Jeong i wsp. [24] na myszach po zakażeniu ich *H. pylori,* zwierzętom podawano odpowiednio: antybiotyk (ES), ekstrakt z *Artemisia capillaris* (bylica włosowata) (MP), zielonej herbaty (GT) lub jednocześnie MP i GT (MPGT) przez 36 tygodni. W odniesieniu do grupy kontrolnej w grupie GT, MP, ES po 24 tygodniach nastąpiło złagodzenie przewlekłego stanu zapalenia żołądka. W 36 tygodniu wykazano, że w tych samych grupach, w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej, został zahamowany proces nowotworzenia. Udowodniono również, że MP oraz GT hamują nadmierną proliferację oraz apoptozę, co wpływa na integralność błony śluzowej żołądka, a także aktywują czynnik śmierci komórkowej oraz indukują apoptozę w komórkach przedrakowych, co prowadzi do powstrzymania rozwoju nowotworu.

2.6. *Olea europaea* (oliwka europejska)

Próby, związane z udowodnieniem działania anty-*H. pylori,* podjęto również z wykorzystaniem oliwy z oliwek, która jest wytwarzana z *Olea europaea*, czyli oliwki europejskiej. Zawiera ona takie związki jak kwas oleinowy oraz w niewielkich stężeniach skwalen, alkohole alifatyczne, czy związki fenolowe – głównie oleuropeiny i hydroksytyrozol, a najbogatsze w te substancje są oliwy z pierwszego tłoczenia. Przeprowadzono próby *in vitro*, w których zbadano wpływ oliwy z oliwek na osiem szczepów *H. pylori*, z których trzy były oporne na klatromycynę i metronidazol. Najbardziej aktywnym związkiem fenolowym z wodnego ekstraktu okazała się być forma dialdehydowa dekarboksy-metylowego kwasu elenolowego, połączona z tyrozolem (TyEDA). Udowodniono, że wykazuje znaczące działanie w stosunku do *H. pylori,* a MIC dla tego związku wynosi 1,3 μg/ml [36, 41, 44]. Badanie z zastosowaniem oliwy z oliwek zrealizowano również *in vivo* i wykorzystano w tym celu olej oznaczony A i B. Eksperyment trwał sześć tygodni. Olej A charakteryzował się trzykrotnie wyższym stężeniem dialdehydowej formy dekarboksymetylowego kwasu elenolowego, połączonego z hydroksytyrozolem (HyEDA) oraz dwukrotnie wyższym stężeniem TyEDA w porównaniu do oleju B. Pierwszą część badania przeprowadzono podając olej A przemyty lub nieprzemyty. W grupie, która otrzymywała olej przemyty, po zakończeniu doświadczenia u sześciu z 30 osób nie wykryto *H. pylori* za pomocą testu ureazowego. W międzyczasie z badania zrezygnowały cztery osoby. W grupie, która otrzymywała olej nieprzemyty, jedynie u dwóch osób z 20, które brały udział w eksperymencie, potwierdzono brak obecności *H. pylori*, a w czasie trwania badania zrezygnowało sześć osób. Z 30 osób, które przyjmowały olej B badanie ukończyło 27 osób, wśród których jedynie u trzech osób test ureazowy wyszedł ujemny [8, 51]. Wskazane byłoby przeprowadzenie badań, obejmujących wpływ oliwy z oliwek z zastosowaniem klasycznego schematu leczenia – potrójnej terapii, aby móc w pełni wykluczyć lub potwierdzić jej skuteczność w zwalczaniu zakażeń *H. pylori.*

2.7. *Cinnamomum verum* (cynamonowiec cejloński)

Cynamonowiec cejloński (*Cinnamomum verum*) znany i wykorzystywany jest w irańskiej medycynie ludowej jako lekarstwo na zapalenie błony śluzowej żołądka. Jego głównym składnikiem aktywnym jest aldehyd cynamonowy, który wykazuje aktywność

przeciwbakteryjną, a także przeciwwirusową. W przeprowadzonych badaniach substancja ta hamowała wzrost wszystkich 30 testowanych szczepów *H. pylori*, a MIC dla aldehydu cynamonowego wyniósł 2 µg/ml w kwaśnym pH [45]. Wykazano również, że *C. verum* może hamować aktywność ureazy i zapobiegać zaburzeniom żołądkowym [38]. W badaniach *in vitro*, w których wykorzystano ekstrakt z cynamonowca wonnego, gatunku blisko spokrewnionego z cynamonowcem cejlońskim, udowodniono, że posiada on działanie przeciwzapalne w stosunku do zainfekowanych przez *H. pylori* komórek żołądka. Aktywność ta wynika z zablokowania szlaku NF-κB przez aldehyd cynamonowy. Autorzy sugerują jednakże, że ekstrakt z cynamonowca ma większy potencjał jako środek przeciwzapalny, niż substancja o aktywności anty-*H. pylori* [37].

2.8. *Aloe vera* (aloes zwyczajny)

Liście aloesu zwyczajnego (*Aloe vera*) od dawna stosowane są w tradycyjnej medycynie przy leczeniu zaparć oraz jako składnik produktów do pielęgnacji skóry. Roślina ta charakteryzuje się również aktywnością przeciwzapalną i przeciwdrobnoustrojową, co związane jest głównie z występowaniem w niej takich związków jak polisacharydy i pochodne antrachinonów, a także bogactwem minerałów, witamin czy kwasów organicznych [15, 19]. Zbadano aktywność miąższu *A. vera* wobec 14 klinicznych szczepów *H. pylori*, z których osiem było wielolekoopornych. Badanie wykazało, że miąższ, już w stężeniu 100 µg/ml, hamuje wzrost połowy izolatów, natomiast zastosowanie dawki 400 µg/ml zatrzymuje wzrost 90% badanych szczepów. Istotne jest również to, że wartości MIC i MBC (minimum bactericidal concentration) były do siebie zbliżone, nawet w przypadku lekoopornych bakterii. W liściach aloesu stwierdzono występowanie pochodnych antrachinonów o działaniu głównie antybakteryjnym, natomiast w miąższu oznaczono: aloeemodynę, chryzofanol, fiscjon, emodynę oraz reinę, wymienione według malejącego stężenia [10]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa aloesu wiąże się również z właściwościami antyadhezyjnymi, za które odpowiadają zawarte w nim polisacharydy. Warto zaznaczyć, że ich ilość i skład jakościowy jest zależny od wieku oraz miejsca uprawy rośliny [15]. Z miąższu aloesowego wyodrębniono dwa oczyszczone polisacharydy (APS-F1 i APS-F2). Wykazano, że drugi z wymienionych związków zawiera 25,6% kwasu galakturonowego, podczas gdy pierwszy jest go pozbawiony. APS-F1 o masie 186,7 kDa, składał się głównie z mannozy, glukozy i galaktozy, natomiast APS-F2 o masie 29,39 kDa, zawierał głównie galaktozę, kwas galakturonowy, arabinozę, ramnozę, mannozę oraz niewielkie ilości glukozy i ksylozy. Właściwości przeciwadhezyjne preparatów zbadano na liniach komórkowych MKN45 metodą koinkubacji z *H. pylori*. Okazało się, że tylko polisacharyd APS-F2 osłabił adhezję drobnoustrojów do komórek MKN45 o 20%, 24% i 36% odpowiednio przy zastosowaniu stężenia 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml i 1 mg/ml [58]. W innym badaniu udowodniono, że miąższ z liści aloesu zwyczajnego wpływa na formowanie się biofilmu bakteryjnego. W doświadczeniu zastosowano subinhibicyjne stężenia miąższu z aloesu od 50 do 6,25 mg/ml, gdzie MIC nie przekraczał 100 mg/ml i zaobserwowano, że prawie we wszystkich badanych układach, wraz ze wzrostem stężenia miąższu, ilość biofilmu bakteryjnego istotnie malała [9].

2.9. *Glycyrrhiza glabra* Linn. (lukrecja)

W tradycyjnej medycynie wschodniej do leczenia wrzodów żołądka używana jest *Glycyrrhiza glabra* Linn. zwana popularnie lukrecją, która pochodzi z Południowej Europy oraz Azji. Wyniki badań, opublikowanych pół wieku temu, z zastosowaniem deglicyryzowanej formy tej rośliny (DGL), podawanej grupie 16 pacjentów (dodatkowo 17 osób należała do grupy przyjmującej placebo) przez okres miesiąca w dawce 760 mg trzy razy dziennie, wykazały pozytywny wpływ DGL i całkowitą eliminację wrzodów żołądka u 44% tych osób w odniesieniu do 6% wyleczonych w grupie placebo [53]. Komercyjny produkt, nazwany GutGard®, pozyskiwany z wyciągu korzeni deglikolizoryzowanych *G. glabra*, którego MIC wynosi od 32 do 64 µg/ml, jest bogaty we flawonoidy, wśród których główną rolę odgrywa glabrydyna. Wpływ GutGard® na *H. pylori* odbywa się prawdopodobnie poprzez zahamowanie syntezy białek, gyrazy DNA lub reduktazy dihydrofolianowej [4]. W celu oceny działania GutGard® przeprowadzono badanie na myszoskoczkach mongloskich (*Meriones unguiculatus*), którym podawano różne dawki ekstraktu. Po okresie ośmiu tygodni zaobserwowano zahamowanie infekcji *H. pylori* u 83% osobników, którym podawano najwyższą dawkę preparatu (60 mg/kg). W tym samym badaniu na modelu mysim wykazano, że ekstrakt z lukrecji może hamować kolonizację *H. pylori* już we wczesnym stadium infekcji [26]. W 2016 roku opublikowano rezultaty badania, przeprowadzonego na 120 osobach, zamieszkujących regiony o zbliżonych współrzędnych geograficznych oraz podobnych cechach klinicznych. Pacjentów podzielono na dwie grupy po 60 osób każda i w obu grupach zastosowano klasyczne leczenie *H. pylori* – terapię potrójną. Dodatkowo osoby w grupie drugiej (grupa LR) suplementowano lukrecją. Wykazano, że w grupie kontrolnej, eradykacja *H. pylori* wystąpiła u 62,5% osób, natomiast w grupie LR zjawisko to zaobserwowano u 83,3% osób. Wyniki jednoznacznie wskazują, że leczenie suplementowane lukrecją posiada skuteczność wyższą o 20% [21].

2.10. *Curcuma longa* (kurkumina)

Lecznicze działanie *Curcuma longa* (kurkumina, ostryż długi) na zakażenie *H. pylori* związane jest z obecnością substancji czynnej – diferoloilometanu, który odpowiada za żółte zabarwienie przyprawy i należy do grupy przeciwutleniaczy polifenolowych. Działanie to polega na hamowaniu wydzielania przez komórki żołądka metaloproteinazy 3 i 9, których obecność związana jest z rozwojem wrzodów i raka żołądka [55]. Stosunkowo niedawno opublikowano wyniki badań z zastosowaniem preparatu Pylorex Plus, w skład którego wchodzi kłącze *C. longa*, owoce *Mallotus philipenensis* (kamala), korzeń *G. glabra* (lukrecja gładka) i kłącze *Zingiber officinale* (imbir lekarski). Doświadczenie prowadzono w Pakistanie na 210 osobach podzielonych na dwie grupy, u których wcześniej zdiagnozowano infekcję *H. pylori*. Pierwsza grupa otrzymywała przez tydzień omeprazol, amoksycylinę, metronidazol i sole bizmutu, natomiast druga przez 15 dni przyjmowała preparat Pylorex Plus. Po czterech tygodniach od zakończenia leczenia określano wskaźnik eliminacji *H. pylori* na podstawie testu oddechowego ze znakowanym mocznikiem oraz na podstawie badania kału pod kątem obecności pałeczki. Ocenie poddawano również zmniejszenie i złagodzenie objawów klinicznych ze strony układu pokarmowego. Wskaźnik eradykacji bakterii wśród osób, które ukończyły badanie w grupie pierwszej wyniósł 62,2%, a w grupie drugiej 55,8%. U osób przyjmujących Pylorex Plus znacznie zmniejszyły się dolegliwości żołądkowo-jelitowe, zarówno u badanych, u których nie potwierdzono obecności *H. pylori* po zakończonym leczeniu, jak i u tych pacjentów, u których bakteria nadal była obecna. Przy porównywalnym wyniku eradykacji drobnoustroju w obu grupach stanowi to istotny rezultat [3].

2.11. *Bryophyllum pinnatum* (żyworódka pierzasta)

Ekstrakt metanolowy z *Bryophyllum pinnatum* (żyworódka pierzasta) ma właściwości przeciwwrzodowe, a wysoka zawartość flawonoidów i fenoli, odpowiadająca za reakcje z wolnymi rodnikami tlenowymi sprawia, że związki te traktowane są jako pierwszorzędowe przeciwutleniacze [28]. Wykonano badanie na myszach szwajcarskich (*Mus musculus* szczepy Swiss), które zaszczepiono zawiesiną *H. pylori*, a następnie podawano im 125, 250, 500 mg/kg ekstraktu roślinnego lub 500 mg/kg ciprofloksacyny przez siedem dni. Próby do badań pobierano pierwszego oraz siódmego dnia i określono wartość MIC na poziomie 32 μg/ml. Odnotowano także w siódmym dniu obserwacji, efekt redukcji kolonizacji błony śluzowej żołądka z 100% do 17% w grupie zwierząt, otrzymujących najwyższą dawkę związków roślinnych oraz ciprofloksacynę. Wykazano, że ekstrakt z żyworódki pierzastej hamuje wzrost *H. pylori*, dodatkowo działając jako przeciwutleniacz i chroniąc błonę śluzową żołądka przed reaktywnymi formami tlenu, powstającymi podczas infekcji [28].

2.12. Olejki eteryczne

Dużą i ważną grupą związków roślinnych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przeciwzapalnym oraz uspokajającym są olejki eteryczne (OE). Tradycyjnie używane są w odstraszaniu moli spożywczych lub jako aromaty spożywcze, składniki perfum, czy element aromaterapii. Pod względem chemicznym olejki eteryczne są głównie mieszaniną terpenów, ale także estrów, alkoholi, aldehydów, fenoli czy ketonów [30, 39]. W badaniach wykazano, że cząber ogrodowy (*Satureja hortensis*, SH), lebiodka pospolita (*Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, OVV) czyli oregano oraz oregano greckie (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, OVH) wykazują aktywność wobec adaptowanego do myszy szczepu *H. pylori* SS1 opornego na metronidazol. Olejki eteryczne tych roślin charakteryzowały się bardzo różnorodną zawartością związków chemicznych, a wśród nich w największej ilości występował karwakrol, γ-terpinen oraz sabinen. Dla wszystkich trzech olejków eterycznych MIC wynosił 2 μl/ml. Ponadto połączenie SH z OVH w stosunku 1:1, 1:2, 2:1 wykazało działanie synergistyczne, przy czym przy ostatnim odnotowano największy efekt – czterokrotne zmniejszenie wartości MIC (do 0,5 μl/ml). Karwakrol stanowił 46,7% olejku z SH oraz 71,1% olejku z OVH, a MIC tego związku wyniósł 0,13 mg/ml, co tłumaczy największą aktywność połączenia SH z OVH [30]. Karwakrol jest również, obok tymolu, podstawową substancją czynną, występującą w *Satureja bachtiarica,* roślinie spotykanej najczęściej na terenie Iranu, tradycyjnie wykorzystywanej jako remedium na mdłości, bóle mięśni, problemy z trawieniem czy różne choroby zakaźne. Liczne badania wykazały, że roślina ta ma szerokie właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Poza karwakrolem i tymolem występują w niej także w mniejszej ilości: p-cymen, γ-terpinen, α-pinen. Zawartość poszczególnych związków może się bardzo różnić w zależności od miejsca uprawy tej rośliny. Aktywność OE sprawdzono na 10 izolatach klinicznych *H. pylori*. Wykazano, że MIC dla olejku eterycznego z *S. bachtiarica* wynosi 0,035 ± 0,13 μl/ml, natomiast dla porównania – MIC dla karwakrolu wynosi 0,0181 ± 0,029 μl/ml, a dla tymolu 0,043 μl/ml [17]. Harmati i wsp. [22], na podstawie wcześniej uzyskanych wyników, przeprowadzili badania *in vivo* na żeńskich osobnikach myszy Balb/c i zastosowali połączenie olejku eterycznego SH i OVH w stosunku 2:1 (2MIX). Jednocześnie, wykorzystując linie komórkowe RAW 264.7, B16F1, HepG2 i THP-1 potwierdzili, że 2MIX wykazuje efekt

cytotoksyczny wobec komórek linii ssaczych jedynie przy zastosowaniu najwyższego badanego stężenia związku (0,01%). Badania *in vivo* zostały przeprowadzone na czterech grupach zwierząt. Jedną z nich stanowiła kontrola negatywna, w której zwierzęta nie zostały zainfekowane oraz nie dostawały żadnego preparatu. Pozostałą część zwierząt zakażono *H. pylori*, a infekcja została potwierdzona po trzech tygodniach za pomocą PCR oraz badania histologicznego wycinków z żołądka. Następnie wyodrębniono trzy pozostałe grupy, w których skład wchodziły: kontrola pozytywna (myszy zakażone, nie otrzymujące preparatu), zwierzęta otrzymujące 2MIX, oraz takie, którym podawano placebo, wykorzystując rozcieńczony olej słonecznikowy. W piątym tygodniu doświadczenia, zwierzęta uśmiercano i w celu oceny kolonizacji ponownie wykonywano badanie PCR i obserwację histologiczną wycinków z żołądka. Do eradykacji doszło u 70% osobników z grupy otrzymującej 2MIX, natomiast olej słonecznikowy nie wykazał żadnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto oceniono poziom 40 cytokin i chemokin w surowicy, a ich profil nie odbiegał do referencyjnego, co sugeruje, że badane OE nie wykazują efektu immunomodulacyjnego. Oceny toksyczności dokonano na podstawie określenia poziomu enzymów wątrobowych – ALT (alanine aminotransferase – aminotransferaza alaninowa) i AST (aspartate aminotransferase – aminotransferaza asparaginianowa) i nie wykazano istotnych odchyleń w wynikach żadnej z badanych grup, co pozwala stwierdzić, że stosowane preparaty nie są toksyczne *in vivo* [22]. W badaniu z zastosowaniem OE z trawy cytrynowej wykazano jednoznacznie, że stopień kolonizacji żołądka myszy przez *H. pylori* uległ znacznej redukcji w porównaniu z nieleczonymi myszami [51]. Inny zespół ocenił aktywność 26 różnych OE wobec szczepu *H. pylori* ATCC 43504. Największą skutecznością cechowały się OE z tymianku (*Thymus vulgaris*) i palczatki wełnistej (*Cymbopogon schoenanthus*), należącej do tej samej rodziny co trawa cytrynowa (MIC i MBC dla obu OE wyniosło 15,6 μg/ml). Podczas analizy składu chemicznego OE wykryto 79 różnych związków (np. pochodne terpenów), które badano m.in. pod kątem zdolności do inhibicji aktywności ureazy. Najwyższą aktywność wykazał OE z jałowca wirginijskiego (*Juniperus virginiana*) dla którego IC50 wyniosło 5,3 μg/ml oraz MIC 15,6 μg/ml. Warto zwrócić uwagę, że olejki eteryczne z tymianku, oregano i palczatki charakteryzowały się względnie wysokimi wartościami IC50 – odpowiednio: 248,7 μg/ml, 208,3 μg/ml, 67,1 μg/ml. Aktywność anty-*H. pylori* wybranych OE została również sprawdzona w badaniu z 22 klinicznymi szczepami, w tym 12 opornymi na co najmniej jeden antybiotyk. Z przeprowadzonych badań wynika, że OE z oregano i jałowca były najbardziej efektywne – MIC90 wynosił 62,5 μg/ml, przy czym stwierdzono brak zależności pomiędzy opornością szczepów na antybiotyki i aktywnością przeciwbakteryjną OE [27].

2.13. Inne rośliny o aktywności anty-*H.pylori*

Działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe wykazuje również szereg innych roślin powszechnie występujących w środowisku. Wodny i alkoholowy ekstrakt z imbiru (*Zingiber officinale)*, zawierający 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, kwasy fenolowe i ich pochodne, w warunkach *in vitro* hamował wzrost izolatów *H. pylori*, opornych na antybiotyki [29, 51]. Ważnym źródłem substancji odżywczych oraz polifenoli o działaniu anty-*H. pylori* są również nasiona migdałowca (*Prunus dulcis*) [29, 45]. Zahamowanie adhezji oraz zmniejszenie stanu zapalnego żołądka, wynikające z obecności *H. pylori*, zaobserwowano zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* z zastosowaniem ekstraktu polifenolowego ze skórek jabłek. Konieczne są jednak dalsze testy przeprowadzone w grupie osób zainfekowanych, które w pełni potwierdzą efekt działania tych związków [41]. Przyleganie bakterii do błony śluzowej żołądka w wysokim stopniu uniemożliwia również ekstrakt z korzenia *Pelargonium sidoides* (Eps), stosowany najczęściej w leczeniu ostrego zapalenia oskrzeli, który może hamować wzrost *H. pylori* zależnie od zastosowanej dawki preparatu (0,001–10 mg/ml) [55, 56].

3. Podsumowanie

W erze narastającej wśród drobnoustrojów antybiotykooporności poszukuje się alternatywnych metod zarówno w zakresie profilaktyki, terapii wspomagającej, jak i leczenia wielu chorób o etiologii bakteryjnej. Coraz częściej sięga się do metod naturalnych, obejmujących m.in. fitoterapię, która opiera się na zastosowaniu preparatów pochodzenia roślinnego. Wykorzystanie roślin w celach terapeutycznych jest praktykowane wśród 80% całej populacji. Ponadto preparaty roślinne dodatkowo postrzegane jako naturalne są stosunkowo mniej toksyczne, rzadziej wywołują negatywne skutki uboczne i są często bardziej korzystne cenowo od dostępnych na rynku chemioterapeutyków. Podejmuje się także próby sprawdzenia skuteczności terapii roślinnej względem Gram-ujemnej pałeczki *H. pylori*. Szacuje się, że połowa populacji na świecie jest zakażona *H. pylori* i coraz częściej mamy do czynienia z opornością tego drobnoustroju na antybiotyki. Dokonany i przedstawiony przegląd danych literaturowych, opisujących wykorzystanie substancji roślinnych w celu eradykacji lub łagodzenia schorzeń związanych z obecnością *H. pylori* jednoznacznie wskazuje na możliwość

szerokiego zastosowania roślin w leczeniu zakażeń, będących wynikiem obecności tej bakterii. Wśród roślin, wykazujących aktywność względem tej chorobotwórczej pałeczki są m.in.: owoce cytrusowe, czosnek, żurawina, brokuł, lukrecja, aloes zwyczajny, zielona herbata czy oliwka europejska. Zaprezentowane i zebrane wyniki badań zespołów z całego świata pokazują, że zawarte w nich roślinne związki aktywne, mają obiecujące predyspozycje w zwalczaniu zakażeń *H. pylori*, co umożliwia modyfikację i udoskonalenie obecnie stosowanej terapii, która coraz częściej jest nieskuteczna. Wiele uzyskanych wyników wymaga jednak potwierdzenia, wydłużenia czasu trwania badania, zwiększenia liczebności grup badanych oraz prowadzenia doświadczeń w warunkach *in vivo* celem wyeliminowania negatywnych skutków fitoterapii.

Piśmiennictwo

1. Ansari S., Yamaoka Y.: *Helicobacter pylori* Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. *Toxins*, **11**, 677 (2019)
2. Arabski M., Koza A., Kaca W.: Struktura chemiczna lipopolisacharydu *Helicobacter pylori* a wrodzona odpowiedź immunologiczna. *Postępy Hig Med. Dosw*, **62**, 289–296
3. Asif H.M., Zaidi S.F., Sugiyama T., Akhtar N., Usmanghani K.: Phytomedicine-based and Quadruple Therapies in *Helicobacter pylori* Infection: A Comparative, Randomized Trial. *Altern. Ther. Health Med.* **21**, 33–39 (2015)
4. Ayala G., Escobedo-Hinojosa W.I., de la Cruz-Herrera C.F., Romero I.: Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* **20**, 1450–1469 (2014)
5. Baj J., Forma A., Sitarz M., Portincasa P., Garruti G., Krasowska D., Maciejewski R.: *Helicobacter pylori* Virulence Factors – Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. Cells, **10**, 27, (2021)
6. Bartnik W., Celińska-Cedro D., Dzieniszewski J., Łaszewicz W., Mach T., Przytulski K., Skrzydło-Radomańska B.: Wytyczne Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące diagnostyki i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori*. *Gastroenterologia kliniczna. Postępy i Standardy*, **6**, 41–49 (2014)
7. Benvenga S., Guarneri F.: Molecular mimicry and autoimmune thyroid disease, *Rev Endocr Metab Disord*, **17**, 485–498 (2016)
8. Castro M., Romero C., de Castro A., Vargas J., Medina J., Milla'n R., Brenes M.: Assessment of *Helicobacter pylori* eradication by virgin olive oil. *Helicobacter*, **17**, 305–311 (2012)
9. Cataldi V., Di Bartolomeo S., Di Camp'li E., Nostro A., Cellini L., Di Giulio M.: *In vitro* activity of *Aloe vera* inner gel against microorganisms grown in planktonic and sessile phases. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **28**, 595–602 (2015)
10. Cellini L., Di Bartolomeo S., Di Campli E., Genovese S., Locatelli M., Di Giulio M.: *In vitro* activity of *Aloe vera* inner gel against *Helicobacter pylori* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **59**, 43–48 (2014)
11. Chang W.L., Yeh Y.C., Sheu B.S.: The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. *J. Biomed. Sci.* **25**, 68 (2018)
12. Chang Y.W., Jang J.Y., Kim Y.H., Kim J.W, Shim J.J.: The Effects of Broccoli Sprout Extract Containing Sulforaphane on Lipid Peroxidation and *Helicobacter pylori* Infection in the Gastric Mucosa. *Gut Liver*, **9**, 486–493 (2015)
13. Chmiela M., Gonciarz W.: Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections. *World J. Gastroenterol.* **23**, 3964–3977 (2017)
14. Chmiela M., Kupcinskas J.: Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **24**, e12638 (2019)
15. Cieślik E., Turcza K.: Właściwości prozdrowotne aloesu zwyczajnego *Aloe vera* (L.) Webb. (*Aloe barbadensis* Mill.). *Post. Fitoter.* **2**, 117–124 (2015)
16. Fahey J.W., Haristoy X., Dolan P.M., Kensler T.W., Scholtus I., Stephenson K.K., Talalay P., Kozniewski A.: Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene induced stomach tumors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7610–7615 (2002)
17. Falsafi T., Moradi P., Mahboubi M., Rahimi E., Momtaz H., Hamedi B.: Chemical composition and anti-*Helicobacter pylori* effect of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil. *Phytomedicine*, **22**, 173–177 (2015)
18. Filocamo A., Bisignano C., Ferlazzo N., Cirmi S., Mandalari G., Navarra M.: *In vitro* effect of bergamot (*Citrus bergamia*) juice against cagA- positive and- negative clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *BMC Complem. Altern. M.* **15**, 256–263 (2015)
19. Gao Y., Kuok K.I., Jin Y., Wang R.: Biomedical applications of *Aloe vera*. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **59**, 244–256 (2019)
20. Gielarowiec K.: *Helicobacter pylori* – charakterystyka drobnoustroju, patogeneza i mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **68**, 213–223 (2016)
21. Hajiaghamohammadi A.A., Zargar A., Oveisi S., Samimi R., Reisiana S.: To evaluate of the effect of adding licorice to the standard treatment regimen of *Helicobacter pylori*. *Braz. J. Infect. Dis.* **20**, 534–538 (2016)
22. Harmati M., Buzas K. i wsp.: Binary mixture of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oils: *in vivo* therapeutic efficiency against *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **22**, e12350 (2017)
23. Iimuro M., Shibata H., Kawamori T., Matsumoto T., Arakawa T., Sugimura T., Wakabayashi K.: Suppressive effects of garlic extract on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Cancer Lett.* **187**, 61–68 (2002)
24. Jeong M., Park J.M., Han Y.M., Kangwan N., Kwon S.O., Kim B.N., Kim W.H., Hahm K.B.: Dietary Intervention of Artemisia and Green Tea Extracts to Rejuvenate *Helicobacter pylori*-Associated Chronic Atrophic Gastritis and to Prevent Tumorigenesis. *Helicobacter*, **21**, 40–59 (2015)
25. Kalali B., Mejías-Luque R., Javaheri A., Gerhard M.: *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediat. Inflamm.* **2014**, 426309 (2014)
26. Kim J.M., Zheng H.M., Lee B.Y., Lee W.K., Lee D.H.: Anti-*Helicobacter pylori* Properties of Gut Gard. *Prev. Nutr. Food Sci.* **18**, 104–110 (2013)
27. Korona-Glowniak I., Glowniak-Lipa A., Ludwiczuk A., Baj T., Malm A.: The *in vitro* activity of essential oils against *Helicobacter pylori* growth and urease activity. *Molecules*, **25**, 586 (2020)
28. Kouitcheu Mabeku L.B., Eyoum Bille B., Tchouangueu T.F., Nguepi E., Leundji H.: Treatment of *Helicobacter pylori* infected mice with *Bryophyllum pinnatum*, a medicinal plant with antioxidant and antimicrobial properties, reduces bacterial load. *Pharm. Biol.* **55**, 603–610 (2017)
29. Krzyżek P.: Polifenole w terapii chorób wywołanych przez *Helicobacter pylori*. *Post. Fitoter.* **18**, 24–30 (2017)
30. Lesjak M., Simin N., Orcic D., Franciskovic M., Knezevic P., Beara I., Aleksic V., Svircev E., Buzas K., Mimica-Dukic N.: Binary and Tertiary Mixtures of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* Essential Oils as Potent Antimicrobial Agents Against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* **30**, 476–484 (2016)

31. Lin Y.T., Kwon Y.I., Labbe R.G., Shetty K.: Inhibition of *Helicobacter pylori* and Associated Urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8558–8564 (2005)
32. Ma J.L., Gail M.H. i wsp.: Fifteen-Year Effects of *Helicobacter pylori*, Garlic, and Vitamin Treatments on Gastric Cancer Incidence and Mortality. *J. Natl. Cancer Inst*. **104**, 488–492 (2012)
33. Mahady G.B., Matsuura H., Pendland S.L.: Allixin, a phytoalexin from garlic, inhibits the growth of *Helicobacter pylori in vitro*. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 3454–3455 (2001)
34. Mandalari G., Bisignano C., Cirmi S., Navarra M.: Effectiveness of Citrus Fruits on *Helicobacter pylori. Evid. Based Complement. Alternat. Med*. **2017**, 8379262 (2017)
35. Matsushima M., Suzuki T., Masui A., Kasai K., Kouchi T., Takagi A., Shirai T., Mine T.: Growth inhibitory action of cranberry on *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 175–180 (2008)
36. Medina E., Brenes M., Garcia A., Romero C., De Castro A.: Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. *J. Food Prot.* **72**, 2611–2614 (2009)
37. Muhammad J.M., Zaidi S.F., Shaharyar S., Refaat A., Usmanghani K., Saiki I., Sugiyama T.: Anti-inflammatory Effect of Cinnamaldehyde in *Helicobacter pylori* Induced Gastric Inflammation. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 109–115 (2015)
38. Nabati F., Mojab F., Habibi-Rezaei M., Bagherzadeh K., Amanlou M., Yousefi B.: Large scale screening of commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease activity. *Daru*. **20**, 72–81 (2012)
39. Najda A.: Roślinne substancje lotne – olejki eteryczne. *Episteme*, **27**, 65–77 (2015)
40. Neto C.C., Weiss E.I. i wsp.: Characterization of non-dialyzable constituents from cranberry juice that inhibit adhesion, co-aggregation and biofilm formation by oral bacteria. *Food Funct*. **8**, 1955–1965 (2017)
41. Parreira P., Duarte M.F., Reis C.A., Martins M.C.L.: *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**, 94–105 (2016)
42. Rizwan M., Fatima N., Alvi A.: Epidemiology and Pattern of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: Scenario from Saudi Arabia. *Saudi. J. Gastroenterol.* **20**, 212– 218 (2014)
43. Roesler B.M., Elizabeth M.A. Rabelo-Gonçalves, Zeitune J.M.R.: Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clin. Med. Insights Gastroenterol*. **7**, 9–17 (2014)
44. Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M., De Castro A.: *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agricultural Food Chem.* **55**, 680–686 (2007)
45. Safavi M., Shams-Ardakani M., Foroumadi A.: Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Pharm. Biol.* **53**, 939–960 (2015)
46. Scaccianoce G., Hassan C., Panarese A., Piglionica D., Morini S., Zullo A.: *Helicobacter pylori* eradication with either seven-day or 10-day triple therapies, and with a 10-day sequential regimen. *Can. J. Gastroenterol*. **20**, 113–117 (2006)
47. Sekiguchi H., Washida K., Murakami A.: Suppressive Effects of Selected Food Phytochemicals on CD74 Expression in NCI-N87 Gastric Carcinoma Cells. *J. Clin. Biochem. Nutr*. **43**, 109–117 (2008)
48. Seyyedmajidi M., Ahmadi A., Hajiebrahimi S., Seyedmajidi S., Rajabikashani M., Firoozabadi M., Vafaeimanesh J.: Addition of cranberry to proton pump inhibitor-based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *J. Res. Pharm. Pract*. **5**, 248–251 (2016)
49. Stoicov C., Saffari R., Houghto J.: Green tea inhibits *Helicobacter growth in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, 473–478 (2009)
50. Takeda K., Utsunomiya H., Kakiuchi S., Okuno Y., Oda K., Inada K, Tsutsumi Y., Tanaka T., Kakudo K.: Citrus Auraptene Reduces *Helicobacter pylori* Colonization of Glandular Stomach Lesions in Mongolian Gerbils. *J. Oleo Sci*. **56**, 253–260 (2007)
51. Takeuchi H., Trang V.T., Morimoto N., Nishida Y., Matsumura Y., Sugiura T.: Natural products and food components with anti-*Helicobacter pylori* activities. *World J. Gastroenterol*. **20**, 8971–8978 (2014)
52. Testerman T.L., Morris J.: Beyond the stomach: An update view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12781–12808 (2014)
53. Turpie A.G.G., Runcie J., Thomson T.J.: Clinical trial of deglycyrrhizinized licquorice in gastric ulcer. *Gut*, **10**, 299–302 (1969)
54. Urban J.: *Helicobacter pylori* – charakterystyka i patogenność. *Dent. Med. Probl*. **47**, 482–486 (2010)
55. Vítor J.M.B., Vale F.F.: Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. *FEMS Immunol. Med. Mic*. **63**, 153–164 (2011)
56. Wang Y.C.: Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10368–10382 (2014)
57. Xiao S.D., Shi T.: Is cranberry juice effective in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection of mice? *Chin. J. Dig. Dis.* **4**, 136–139 (2003)
58. Xu C., Ruan X.M., Li H.S., Guo B.X., Ren X.D., Shuang J.L., Zhang Z.: Anti-adhesive effect of an acidic polysaccharide from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger on the binding of *Helicobacter pylori* to the MKN-45 cell line. *J. Pharm. Pharmacol.* **62**, 1753–1759 (2010)
59. Yanagawa Y., Yamamoto Y., Hara Y., Schimamura T.: A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth *in vitro*. *Curr. Microbiol.* **47**, 244–249 (2003)
60. Yanaka A.: Sulforaphane enhances protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress *in vitro*, and demonstrates anti-inflammatory effects on *Helicobacter pylori* infected gastric mucosae in mice and human subjects. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 1532–1540 (2011)
61. Zamani M., Ebrahimtabar F., Zamani V., Miller W.H., Alizadeh-Navaei R., Shokri-Shirvani J., Derakhshan M.H.: Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **47**, 868–876 (2018)
62. Zardast M., Namakin K., Esmaelian Kaho J., Hashemi S.S.: Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with *Helicobacter pylori* using urease breath test. *Avicenna J. Phytomed*. **6**, 495–501 (2016)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 2, 173–177

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 1 z 2021 r. kwartalników *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology*, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

I. Zgodnie ze Statutem PTM raz w roku odbywa się zebranie członków ZG PTM. Przeprowadzono je 22.03.2021 r. w formie on-line, korzystając z pomocy informatycznej Narodowego Instytutu Leków. Materiały związane z zebraniem wcześniej rozesłano e-mailowo do członków ZG PTM i zaproszonych osób.
W zebraniu udział wzięli Prezydium ZG PTM, Przewodniczący Oddziałów Terenowych PTM lub ich przedstawiciele, z wyjątkiem reprezentacji Oddziału PTM w Rzeszowie, Przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej PTM oraz Redaktorzy naczelni czasopism PTM.
Podczas Zebrania ZG PTM poruszano następujące zagadnienia:

1. Przedstawiono informację o działalności Prezydium PTM od 30.03.2020 r. – poprzedniego zebrania ZG PTM. W załączeniu przesłano informacje o PTM zamieszczone w numerach czasopism PM i PJM: 2 – 2020, 3 – 2020, 4 – 2020, 1 – 2021.
   Podjęto **Uchwałę 4-2021** w sprawie akceptacji działalności Prezydium ZG PTM za miniony okres roczny.
2. Podjęto **Uchwałę 5-2021** w sprawie uporządkowania listy członków zwyczajnych oraz członków wspierających PTM i usunięcia z niej osób i firm niepłacących składki członkowskiej za 2020 r. w statutowo przewidzianym terminie. W porównaniu z ubiegłym rokiem podobna jest liczba osób nieopłacających składki członkowskiej za rok 2020 r., pomimo przypominania o tym podstawowym obowiązku członka PTM przez OT PTM w styczniu 2021 r. i następnie dwukrotnie przez sekretariat ZG PTM w lutym i marcu b.r. Imienne listy osób usuwanych z poszczególnych Oddziałów zestawiono w **załączniku 1 do Uchwały 5-2021.**
3. Podjęto **Uchwałę 6-2021** w sprawie przyjęcia pięciu nowych członków zwyczajnych PTM (**Załącznik 1 do Uchwały 6-2021**).
4. Spotykamy się z sytuacją, że osoby zaakceptowane Uchwałami PTM jako członkowie zwyczajni nie opłacają pierwszej składki członkowskiej, pomimo wyraźnej informacji, że trzeba spełnić oba warunki, aby być przyjętym do PTM. Na podstawie **Uchwały 12-2020**, usunięto ponad 40 deklaracji członka zwyczajnego, zaakceptowanych Uchwałami ZG PTM, którym nie towarzyszyła pierwsza opłata składki członkowskiej wniesiona w ciągu 6 miesięcy od daty Uchwał.
5. Zgodnie z **Uchwałą 33-2017** i **Uchwałą 2-2019** oraz **„Regulaminem wydatkowania i rozliczania środków pieniężnych przez Oddziały Terenowe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów"** każdy Oddział otrzymuje co roku fundusz złożony z 10% kwoty uzyskanej z tytułu składek członkowskich, 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora ogólnego, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty na rzecz PTM oraz 100% kwoty od sponsora konkretnego wydarzenia organizowanego przez dany Oddział. Przedstawiono Tabelę dotyczącą liczby członków w Oddziałach oraz Tabelę przyznanych Oddziałom środków finansowych na przestrzeni kolejnych ostatnich 3 lat.
   Dyskutowano nad rozwiązaniem problemu kumulacji środków niewykorzystywanych przez Oddziały, ponieważ za kilka lat mógłby pojawić się problem, że w jednym roku kilka Oddziałów chciałoby wykorzystać swoje nagromadzone fundusze, a wtedy budżet PTM może tego nie udźwignąć. Prezydium ZG PTM zaproponowało, aby Oddziały wydatkowały fundusze w okresie 3-letnim, jednakże po dyskusji zdecydowano, że będzie to okres czterech lat, od dnia przyznania środków, w którym należy wydatkować fundusze z danego roku. Tym samym Oddział dysponuje daną kwotą przez okres 4 lat i nie wpływa to na otrzymywanie funduszy w kolejnych latach. Po upłynięciu 4 lat niewykorzystana kwota z danego roku wraca do ogólnej puli środków PTM. Nie wpływa to na dostępność dla OT PTM sum funduszy z ostatnich 3 lat. Podjęto w tej sprawie **Uchwałę 7-2021.** Schemat zdefiniowania okresu wydatkowania funduszy przez OT PTM przedstawiono w **Załączniku 1 do Uchwały 7-2021**.
   Sekretariat ZG PTM co roku zobowiązany jest do przedstawienia danych dotyczących liczby członków w Oddziałach oraz przyznanych Oddziałom środków finansowych w kolejnych latach. Zwrócono uwagę na fakt koniecznego udziału Komisji Rewizyjnych Oddziałów w kontrolowaniu zgodności ze Statutem PTM wydatkowania środków finansowych przez Oddziały.

6. Przewodnicząca Oddziału Łódzkiego PTM zwróciła się z prośba o objęcie patronatem przez PTM „IV Sesji Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego", które odbędzie się 23.06.2021 r. w formie on-line na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Podjęto pozytywną **Uchwałę 8-2021** w tej sprawie.

7. Przedstawiono informację o stanie finansowym PTM oraz Uchwałę Głównej Komisji Rewizyjnej PTM z 19.03.2021 r. w sprawie zatwierdzenia Sprawozdania Finansowego PTM za rok 2020. Z uznaniem podkreślono zakończenie roku 2020 zyskiem w wysokości ponad 28 tysięcy zł, co związane jest przede wszystkim z działalnością redakcji Polish Journal of Microbiology.

8. Przewodniczący Oddziałów Terenowych przedstawili sprawozdania z działalności Oddziałów w okresie od 30.03.2020 r. do 22.03.2021 r. oraz plany Oddziałów na 2021 r. Okres pandemii znacznie przyhamował działalność Towarzystwa. Niektóre Oddziały przeprowadzały spotkania on-line. Postanowiono, że adresy elektroniczne linków z dostępem do wykładów odbywających się w Oddziałach zostaną przesyłane do Sekretariatu ZG PTM, a następnie udostępnione na stronie PTM do wykorzystania przez zainteresowane osoby z innych Oddziałów.

9. Przewodniczący Oddziałów oraz członkowie Prezydium PTM przedstawili opinie i stanowiska w sprawie organizacji Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM oraz Walnego Zgromadzenia Delegatów, podczas którego wybierani są członkowie Prezydium PTM i Głównej Komisji Rewizyjnej PTM. Zdecydowanie przeważała opinia, aby w obecnej sytuacji epidemicznej nie organizować Zjazdu PTM w 2021 roku, lecz przenieść Zjazd na 2022 rok.
Wiele osób jest zmęczonych zarówno walką z pandemią COVID-19 jak i koniecznością prowadzenia zajęć i nauczania on-line. Ograniczone są możliwości i okres prowadzenia badań naukowych. Bardzo odczuwalny jest brak kontaktów międzyludzkich i możliwości bezpośrednich dyskusji. Spodziewamy się, że za półtora roku sytuacja epidemiczna będzie na tyle opanowana, przy realizacji masowych szczepień, że możliwe będzie przeprowadzenie Zjazdu w tradycyjnej formie, uwzględniającej wykłady i dyskusje na sali oraz prezentacje plakatów i dyskusje przy nich. Możliwe będzie również bezpośrednie spotkanie mikrobiologów. Biorąc pod uwagę wypowiedzi Przewodniczących Oddziałów przygotowano i następnie podjęto **Uchwałę 9-2021** dotyczącą przesunięcia Zjazdu PTM i Walnego Zgromadzenia Delegatów PTM na rok 2022.

10. Przedstawiono informacje z FEMS oraz IUMS.
W dniach 16–20.11.2020 r. odbył się Międzynarodowy Kongres International Union of Microbiological Societies IUMS 2020 w Daejeon w Korei Południowej w formie hybrydowej. Planowany na 11–15.07.2021 r. w Hamburgu Kongres FEMS 2021 nie odbędzie się, natomiast w terminie 20–24.06.2021 odbędzie się on-line wspólny kongres FEMS i ASM (American Society for Microbiology): World Microbe Forum 2021. https://www.worldmicrobeforum.org/.
Brak informacji z FEMS o ewentualnym przyznaniu grantów dla młodych naukowców z Polski. Wprowadzony w FEMS od zeszłego roku sposób informowania towarzystw o otrzymanych grantach nie pozwala na uzyskanie wiedzy o liczbie i tematyce aplikowanych wnioskach grantowych.
FEMS przyjął, że International Microorganisms Day będzie odbywać się 17 września każdego roku.
Pani prof. dr hab. Elżbieta Anna Trafny, Członek Prezydium PTM, Redaktor Naczelna Polish Journal of Microbiology, została włączona do grona naukowców oceniających składane projekty grantowe, FEMS Grant Committee. Jest to duży sukces Pani profesor i wyraz uznania dla naszego Towarzystwa.

11. Informacje o wydawanych przez PTM czasopismach: *Polish Journal of Microbiology* (PJM) oraz *Advancents of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* (PM).

* Kwartalnik PJM powiększył w ostatnim roku wartości współczynnika IF oraz CiteScore, które obecnie wynoszą: Impact Factor 2019: 0,897 / 5-year 1,052; CiteScore 2019: 1,3.
Po raz pierwszy w historii czasopisma zaczęło ono przynosić zysk Towarzystwu, ponieważ przychody związane z opłatami redakcyjnymi przewyższyły koszty wydawania czasopisma. Redakcja nie ma problemów z napływem manuskryptów, głównie od autorów z krajów dalekiego wschodu. Obserwowane są trudności z pozyskiwaniem recenzentów i utrzymaniem krótkiego terminu od otrzymania manuskryptu do decyzji odnośnie publikacji.

* Kwartalnik PM powoli przekształca się w czasopismo o szerokim odbiorze międzynarodowym, powiększając liczbę artykułów w języku angielskim. Do redakcji zaczynają przychodzić manuskrypty autorów zagranicznych. Redakcja sygnalizuje małą liczbę nadsyłanych manuskryptów i trudności z pozyskaniem recenzentów. Wydaje się jednak, że przyjęty kierunek rozwoju czasopisma w oparciu o współpracę z wydawnictwem Exeley jest właściwy. Wymagany jest jednak czas aby wprowadzane zmiany w kierunku umiędzynarodowienia czasopisma zaczęły przynosić wymierne efekty w postaci wzrostu współczynników oceny czasopisma, zwłaszcza cytowalności i IF oraz dużej liczby autorów zagranicznych.

W trakcie dyskusji nad rozwojem czasopism podnoszono kwestię zwiększenia cytowalności publikacji z czasopism PTM, a także listy MNiSW dotyczącej punktowanych czasopism.
Oba czasopisma znajdują się na liście filadelfijskiej, ale mają niską punktację MNiSW: PM – 20, a PJM – 40 punków.

12. Na dzień 31 marca 2021 r. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów liczy 860 członków. Najliczniejsze oddziały terenowe, to OT Warszawa – 156 członków i OT Kraków – 113 członków.

II. Prezydium ZG PTM podjęto **Uchwałę 10-2021** w sprawie organizacji przełożonego na 2022 rok Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM w nowym terminie tj. dniach **13–16.09.2022 r.** w Warszawie. Podejmujemy starania, aby zachować przyznane środki finansowe przez MNiSW na organizację Zjazdu w nowym terminie. Natomiast FEMS wyraziła już zgodę na przesunięcie przyznanych środków na organizacje Zjazdu w 2022 r.

III. Prezydium ZG PTM podjęło **Uchwałę 11-2021** w sprawie objęcia patronatem cyklicznej konferencji: „POMORSKIE SPOTKANIA Z MIKROBIOLOGIĄ", w tym roku pt. „Drobnoustroje – wrogowie i sprzymierzeńcy", w dniach 24–25.06.2021 r. w formie on-line. Organizatorem Konferencji była Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz **Oddział PTM w Gdańsku.**

IV. Na stronie PTM udostępniono link do zebrania naukowo-szkoleniowego organizowanego przez **Odział PTM w Bydgoszczy** oraz firmę ARGENTA w dniu – 23.04.2021 r.

V. **Oddział PTM w Krakowie** w dniu 29.04.2021 r. przeprowadził ogólnodostępne szkolenie on-line na temat: „Leptospira – powracający patogen". Na stronie PTM udostępniono link do szkolenia.

VI. **Oddział PTM we Wrocławiu** współorganizował Konferencje Naukowo-Szkoleniową pt; „Nowe technologie w laboratorium okresu pandemii COVID-19", która odbyła się w formie zdalnej 18.05. 2021 r. Na stronie PTM udostępniono link do konferencji.

VII. **Oddział PTM w Krakowie** zaprosił na wykład on-line pt.: „Odporność poszczepienna – w tym po szczepieniach przeciw COVID-19", który odbył się 27.05. 2021 r.

VIII. Na stronie PTM udostępniono link do konferencji cyklicznej „HydroMikro2021", której współorganizatorem byli członkowie **Oddziału PTM w Gdańsku**, pt. „Mikroorganizmy w środowisku wodnym – zagrożenia i nadzieje". Konferencja odbyła się on-line 09–11.06.2021 r. w Instytucie Oceanologii PAN w Sopocie.

IX. **Oddział PTM w Szczecinie** zapraszał na spotkanie naukowo-szkoleniowe na temat: Wirus SARS-CoV-2 a układ odpornościowy człowieka, on-line 10.06.2021 r.

X. Prezydium ZG PTM podjęto **Uchwałę 12-2021** w sprawie przyjęcia jedenastu nowych członków zwyczajnych PTM (**Załącznik 1 do Uchwały 12-2021**).

XI. **Uchwałą 13-2021** Prezydium ZG PTM objęło patronatem konferencję „IV Mazowieckie Spotkanie Mikrobiologów i Epidemiologów" organizowaną w wersji on-line w dniu 07.06.2021 r. przez Konsultanta Wojewódzkiego w dziedzinie Mikrobiologia Lekarska Panią Prof. dr hab. Ewę Augustynowicz-Kopeć.

XII. **Uchwałą 14-2021** Prezydium ZG PTM zdecydowało o zawarciu umowy z Panią mgr Karoliną Stępień dotyczącej wprowadzania informacji na stronę PTM oraz do portalu facebook, w latach 2021–2022.

XIII. Informowaliśmy i zapraszaliśmy członków PTM do udziału w pierwszym wspólnym Kongresie Federacji Europejskich Towarzystw Mikrobiologicznych (FEMS) i Amerykańskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego (ASM): The 2021 World Microbe Forum, on-line 20–24 czerwca 2021 r. Siedmiu członków PTM wzięło udział w tym Kongresie uzyskując zniżki w opłacie rejestracyjnej.

XIV. FEMS zakłada, że pandemia SARS-CoV-2 wkrótce wygaśnie i zaprasza do udziału w konferencji organizowanej w formie klasycznej – stacjonarnej „Conference on Microbiology 2022" w dniach 30 czerwca – 2 lipca 2022 r. w Belgradzie, Serbia. Informacje na stronie PTM.

Warszawa, 14.06.2021 r.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
13-16 WRZEŚNIA 2022,
WARSZAWA
PTM
POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
13-16 WRZEŚNIA 2022,
WARSZAWA
Miejsce Zjazdu:
Sangate Hotel Airport
Warszawa, ul. Komitetu Obrony Robotników 32
(dawniej 17 Stycznia, róg ul. Żwirki i Wigury)
Główny Organizator Zjazdu:
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa
ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.

HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.

Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń. Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.

Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

SPIS TREŚCI

Wspomnienie o Pani Profesor Danucie Dzierżanowskiej 111

N. Akçelik, M. Akçelik – Charakterystyka i mechanizmy regulacji powstawania biofilmu u *Salmonella* 113
J. Bratosiewicz-Wąsik, T.J. Wąsik – Koronawirusy – jak interakcje kilku białek zmieniły nasze postrzeganie świata 121
A. Wyszyńska, R. Jabłuszewski – Glikozylacja białek w komórkach bakteryjnych i jej potencjalne zastosowania 137
A. Kiecka, B. Macura, M. Szczepanik – Wpływ mikrobioty układu rozrodczego na płodność żeńską i męską. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* 151
M. Siwińska, M. Mucha, A. Pyrzanowska, M. Szlaur – Fitoterapia w profilaktyce i wspomaganiu leczenia zakażeń *Helicobacter pylori* 161

KOMUNIKATY, INFORMACJE 173

CONTENTS

In memory of Professor Danuta Dierżanowska 111

N. Akçelik, M. Akçelik – Characteristics and regulation of biofilm formation in *Salmonella* 113
J. Bratosiewicz-Wąsik, T.J. Wąsik – Coronaviruses – how protein interactions changed our perception of the world 121
A. Wyszyńska, R. Jabłuszewski – Protein glycosylation in bacterial cells and its potential applications 137
A. Kiecka, B. Macura, M. Szczepanik – The influence of the reproductive system microbiota on female and male fertility. The role of *Lactobacillus* bacteria 151
M. Siwińska, M. Mucha, A. Pyrzanowska, M. Szlaur – Phytotherapy in the prevention and support of treatment of *Helicobacter pylori* infections 161

NEW REPORTS, INFORMATION 173

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Cena 1 zeszytu 40 zł + VAT 8%