

## Streszczenie pracy doktorskiej lek. Mirosława Drózdza

**Promotor:** dr hab. Jacek Czepiel

**Temat pracy doktorskiej:** „*Selected elements of the pathogenesis of Clostridium difficile infection*” – cykl publikacji

(„*Wybrane elementy patogenezы zakażenia Clostridium difficile*”)

### **Wprowadzenie**

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) jest Gram dodatnią, beztlenową laseczką, szeroko rozpowszechnioną w środowisku człowieka, po raz pierwszy wyizolowaną ze stolca zdrowego noworodka przez Ivana Halla oraz Elizabeth O'Toole z Uniwersytetu Colorado w Denver, USA. Począwszy od przełomu dwudziestego i dwudziestego pierwszego wieku doszło do gwałtownego wzrostu zarówno częstości, jak i ciężkości zakażeń *C. difficile* (CDI, *Clostridium difficile*infection). Przyczyną narastania częstości CDI jest wzrost stosowania antybiotyków, powiększanie się wraz z rozwojem medycyny liczby pacjentów będących osobami z grupy ryzyka rozwoju CDI, a także pojawienie się epidemicznych zachorowań spowodowanych hiperwirulentnym szczepem PCR rybotyp 027 (RT 027). Do zakażenia dochodzi w wyniku rozprzestrzeniania się spor, które są odporne na wysoką temperaturę, kwaśne środowisko i antybiotyki. Podstawową barierą ochronną człowieka przed kolonizacją *C. difficile* jest flora jelitowa, a jej zniszczenie przez antybiotyki i kolonizacja przewodu pokarmowego przez *C. difficile* jest pierwszym krokiem do rozwoju zakażenia. Przy czym do objawów choroby dochodzi tylko u części osób, u których doszło do kolonizacji. Sam patogen nie jest bezpośrednio inwazyjny, a czynnikami jego zjadliwości są wytwarzane przez drobnoustrój enzymy, takie jak kolagenaza, hialuronidaza, chondroityno-sulfataza oraz toksyny, które niszczą cytoszkielet nabłonka jelita, stymulują adhezję neutrofilii do ściany jelita z następowym rozwojem miejscowego stanu zapalnego i utratą integralności i funkcjonalności błony śluzowej jelita. Dwoma najważniejszymi toksynami *C. difficile* są toksyna A i B. Ponadto w patogenezie CDI odgrywają rolę cytokiny interleukina 8 (IL-8), interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) oraz leukotrien B4

Mimo licznych badań odsłaniających mechanizm patogenezы CDI, nadal nie został on w pełni poznany. Wciąż nie w pełni jest jasne, dlaczego u niektórych chorych dochodzi do ciężkiego przebiegu infekcji, do jej nawrotów, a u innych osób, zbliżonych wiekowo oraz z podobnymi schorzeniami współistniejącymi, przebieg jest łagodny i do nawrotów nie dochodzi.

### **Cel pracy**

Celem przeprowadzonych badań była:

1. Ocena roli polimorfizmów IL-1 $\beta$  i IL-8 w zakażeniu *C. difficile*, ich wpływ na rozwój, nawrotowość tej choroby, wpływ na występowanie markerów krwi typowych dla ciężkiego przebiegu zakażenia CDI.
2. Ocena zachowania się kwasów tłuszczowych w osoczu w toku zakażenia *C. difficile*.
3. Ocena możliwości wykorzystania pomiaru stężenia kalprotektyny w kale (FC, *fecalcalprotectin*) w różnicowaniu pacjentów z ciężką i nie ciężką postacią zakażenia *C. difficile*.

## Metodyka

W pierwszym artykule zatytułowanym "The presence of IL-8 +781 T/C polymorphism is associated with the parameters of severe *Clostridium difficile* infection" oceniano wpływ polimorfizmów genetycznych IL-1 $\beta$  i IL-8 na rozwój CDI, jego patogenezę zarówno z klinicznego, jak i biochemicznego punktu widzenia, nasilenie i nawrotowość tej choroby. Oznaczanie polimorfizmów genów cytokin przeprowadzono za pomocą zestawu DNA Qiamp DNA Mini Kit (ekstrakcja DNA). Genotypowanie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) przeprowadzono przy użyciu testów TaqMan SNP IL-1 $\beta$  +3953 A/G (rs1143634), -31 A/G (rs1143627), IL-8 +781 T/C (rs2227306) z wykorzystaniem CFX384 Touch System do wykrywania PCR w czasie rzeczywistym. Badania morfologii krwi z rozmazem, stężenie kreatyniny i białka C-reaktywnego (CRP, *C reactive protein*) we krwi wykonywano zgodnie z ogólnie przyjętymi standardowymi metodami. W badaniu wzięło udział 65 pacjentów z CDI i 65 zdrowych ochotników.

W drugim artykule zatytułowanym "*Clostridium difficile* caused changes in fatty acids profile and resolvin D1 content in plasma of infected patients" dokonano oceny zawartości kwasów tłuszczowych w osoczu pacjentów z CDI i grupie kontrolnej za pomocą chromatografii gazowej. Zawartość RvD1 w osoczu analizowano za pomocą testu ELISA. Badania morfologii krwi z rozmazem, stężenie CRP we krwi wykonywano zgodnie z ogólnie przyjętymi standardowymi metodami. W badaniu wzięło udział 40 pacjentów z CDI i 40 zdrowych ochotników.

W trzecim artykule zatytułowanym "The level of fecal calprotectin significantly correlates with *Clostridium difficile* infection severity" oceniono korzyści z testowania FC w ocenie ciężkości CDI za pomocą testu immunoenzymatycznego. Przeprowadzono retrospektywną analizę danych demograficznych i klinicznych, a także wyników badań krwi (morfologia krwi, GFR-współczynnik przesączania kłębuszkowego, stężenie kreatyniny, albumin i CRP). Badania morfologii krwi z rozmazem, stężenie kreatyniny, albumin i CRP we krwi były wykonane zgodnie z ogólnie przyjętymi standardowymi metodami. W badaniu wzięło udział 76 pacjentów z CDI.

## Bioetyka

Na przeprowadzenie badań uzyskano świadomą, pisemną zgodę pacjentów, prace realizowano na podstawie akceptacji Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o numerach: KBET/196/B/2011, KBET/207/B/2014, KBET/6/B/2014, 1072.6120.51.2018. Badania przeprowadzone zostały zgodnie z Deklaracją Helsińską.

## Wyniki

W pierwszym badaniu wykazano, iż polimorfizmy IL-1 $\beta$  +3953 A/G (rs1143634), -31 A/G (rs1143627) i IL-8 +781 T/C (rs2227306) nie miały wpływu na zapadalność na CDI i nawrót tej choroby. Stwierdzono jednak, że istnieje statystycznie istotna korelacja między liczbą leukocytów i neutrofilii, a obecnością polimorfizmu IL-8 +781 T/C (rs2227306) (odpowiednio  $p=0,007$ ,  $p=0,03$ ). Pacjenci z wariantem TC charakteryzowali się znacząco większą liczbą leukocytów i neutrofilii w porównaniu do pacjentów z wariantem TT (odpowiednio  $13,2$  vs  $6,2 \times 10^3/\mu\text{l}$  i  $9,0$  vs  $4,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). W sytuacji, gdy pacjentów podzielono na podgrupy z ciężkim przebiegiem CDI i nie ciężkim przebiegiem CDI, wykazano, iż wariant T/C SNP IL-8 +781 cechował się statystycznie istotnym wyższym ryzykiem rozwoju ciężkiego przebiegu CDI ( $p=0,03$ ). Nie zaobserwowano takich korelacji dla SNP IL-1 $\beta$  + 3953 A/G (rs1143634) i -31 A / G (rs1143627).

W drugim badaniu stwierdzono, że wskaźnik SFA (nasyconych kwasów tłuszczowych, *saturated fatty acids*) w osoczu (36,2%) był statystycznie wyższy w osoczu pacjentów z CDI w porównaniu z grupą kontrolną (27,0%,  $p < 0,001$ ). Stwierdzono istotne statystycznie różnice między badanymi grupami dla C14:0, C15:0, C16:0 i C17:0. Poziom n-6 kwasów tłuszczowych w osoczu był podobny w obu badanych grupach (23,8% dla kontroli i 25,5% dla CDI). Poziom n-3 kwasów tłuszczowych był statystycznie istotnie niższy w osoczu pacjentów z CDI w porównaniu z grupą kontrolną (7,8 w porównaniu do 19,4%,  $p < 0,001$ ). W grupie CDI zaobserwowano obniżenie poziomów C18:3 n-3 w porównaniu z grupą kontrolną (1,9 w porównaniu do 10,7%,  $p < 0,001$ ). Stosunek n-3/n-6 w osoczu był statystycznie znacząco niższy (prawie trzykrotnie) u pacjentów z CDI (stosunek 0,4) w porównaniu z grupą kontrolną (stosunek 1,1). Aktywność elongazy (obliczonej jako stosunek C18:0/C16:0) i aktywność desaturazy delta 6 (obliczonej jako C18:3 n-6/C18: 2 n-6) były znacząco niższe w grupie CDI (odpowiednio  $p=0,01$  i  $p=0,001$ ). Stężenie RvD1 było istotnie wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu z pacjentami z CDI (odpowiednio  $162 \pm 52$  vs  $132 \pm 42$  pg/ml;  $p=0,02$ ).

W trzecim badaniu stwierdzono, iż poziom kalprotektyny w kale był typowy dla osób z zapaleniem jelita grubego (739  $\mu\text{g/g}$ ,  $Q_{25}$ - $Q_{75}$  612-799  $\mu\text{g/g}$ ). Stwierdzono statystycznie

wyższe stężenie FC u pacjentów z ciężkim przebiegiem CDI w porównaniu do nie ciężkiego CDI (wartość dla ciężkiego CDI wynosiła 770, dla nie ciężkiego 659  $\mu\text{g/g}$ ;  $p=0,009$ ). W badanej grupie stwierdzono 20 zgonów wśród 76 osób, z których 13 można było na podstawie historii choroby powiązać bezpośrednio z CDI. W pozostałych 7 przypadkach CDI było skutecznie leczone, a do zgonu dochodziło z innego powodu. Śmiertelność wyniosła 17% ( $n = 13/76$ ), uwzględniając tylko zgony bezpośrednio związane z CDI oraz 26% ( $n = 20/76$ ), w sytuacji uwzględnienia wszystkich zgonów. W przypadku gdy zgon był bezpośrednio związany z CDI czas od rozpoznania do śmierci wynosił średnio 10 dni (1–22 dni). W pozostałych 7 przypadkach termin ten wynosił 36 dni (21–45 dni). Nie było istotnej różnicy w poziomie FC między grupą bez zgonów związanych z CDI, a zgonami związanymi z CDI. Jednak znacznie wyższe wartości leukocytów (13,7 w porównaniu do  $8,04 \times 10^3/\mu\text{l}$ ;  $p=0,03$ ), kreatyniny (163 w porównaniu do  $85 \mu\text{mol/l}$ ;  $p=0,004$ ) i CRP (198 w porównaniu do  $51 \text{ mg/l}$ ;  $p<0,001$ ) i niższy GFR (37 w porównaniu do  $74 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ;  $p=0,002$ ) i albuminy (24 w porównaniu do  $29 \text{ g/l}$ ;  $p=0,009$ ) obserwowano u osób, które zmarły, w porównaniu do osób, u których do zgonu nie doszło. Celem ostatniego testu była ocena, czy stężenie kalprotektyny koreluje z badanymi parametrami krwi, wykazano tylko jedną taką korelację - pomiędzy FC a płytkami krwi ( $r=0,28$ ;  $p=0,02$ ).

## **Wnioski**

1. Wyniki pierwszego badania wskazują, iż obecność polimorfizmu IL-8 +781 T/C jest związana z ciężkim przebiegiem CDI. Obecność polimorfizmów IL-1 $\beta$  +3953 A/G, -31 A/G i IL-8 +781 T/C nie wpływa na rozwój, ani nawrotowość CDI.
2. Wyniki drugiego badania wskazują, iż w toku CDI dochodzi do wyraźnych zmian w składzie osoczowych kwasów tłuszczowych. W przypadku pacjentów cechujących się dobrym rokowaniem najpewniej zaobserwowano skuteczne ustępowanie stanu zapalnego, co znalazło odzwierciedlenie w znaczącym zmniejszeniu n-3 kwasów tłuszczowych u osób z CDI w stosunku do grupy kontrolnej.
3. Wyniki trzeciego badania wskazują, iż w toku CDI stężenie FC jest typowe dla ostrego stanu zapalnego jelit. Stężenie FC statystycznie istotnie korelowało z ciężkością CDI, co pokazuje, że może ona służyć jako marker predykcyjny oceny ciężkości CDI. Poszukiwanie markerów ciężkości CDI jest szczególnie istotne, ich znajomość umożliwi szybką i optymalną włączanie leczenia przyczynowego CDI.

## Streszczenie w języku angielskim

### **Introduction**

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) is a Gram positive, anaerobic rod, broadly environment, first isolated from the stool of a healthy newborn by Ivan Hall and Elizabeth O'Toole from the University of Colorado in Denver, USA. Beginning at the turn of the twenty and twenty-first centuries, both the frequency and severity of *C. difficile* infection (CDI) increased rapidly. The reason for that is the increase in the use of antibiotics, the increase in the number of patients who are at risk of developing CDI with the development of medicine, and also the appearance of the epidemic infections caused by hypervirulent strain ribotype PCR 027 (RT 027). Infection occurs as a result of the spread of spores that are resistant to high temperatures, acidic environments and antibiotics. The basic human protective barrier against colonization of *C. difficile* is intestinal flora and its destruction by antibiotics and colonization of the gastrointestinal tract by *C. difficile* is the first step to developing an infection. The symptoms of the disease occur only in some people who have colonized. The pathogen itself is not directly invasive, and the factors of its virulence are microbial enzymes such as collagenase, hyaluronidase, chondroitin-sulfatase and toxins that destroy the cytoskeleton of the intestinal epithelium, stimulate neutrophil adhesion to the intestinal wall with subsequent inflammation and loss of local integrity and functional intestinal mucosa. The two most important *C. difficile* toxins. are toxins A and B. In addition, cytokines interleukin 8 (IL-8), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) and leukotriene B<sub>4</sub> play a role in the pathogenesis of CDI.

Despite numerous studies revealing the mechanism of CDI pathogenesis, it has still not been fully understood. It is still not fully clear why some patients develop a severe infection, its recurrence, and in others who are similar in age and with similar comorbidities, the disease is mild and no recurrence occurs.

### **Aim of the studies**

#### **The aim of the studies was:**

1. Assessment of the role of IL-1 $\beta$  and IL-8 polymorphisms in *C. difficile* infection, their impact on development, recurrence of this disease, and influence on blood markers typical for severe CDI infection.
2. Assessment of plasma fatty acids (FA) behavior during *C. difficile* infection.
3. Assessment of the possibility of using fecal calprotectin (FC) measurement in the differentiation of patients with severe and non-severe *C. difficile* infection.

## **Methodology**

The first study entitled "The presence of IL-8 +781 T/C polymorphism is associated with the parameters of severe *Clostridium difficile* infection" assessed the influence of genetic polymorphisms of IL-1 $\beta$  and/or IL-8 on the development of CDI, its pathogenesis both from the clinical and biochemical standpoint, severity and the recurrence of this disease. Determination of cytokine gene polymorphisms was performed with the use of DNA Qiaamp DNA Mini Kit (DNA extraction). Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping was performed using TaqMan SNP Genotyping Assays IL-1 $\beta$  +3953 A/G (rs1143634), -31 A/G (rs1143627), IL-8 +781 T/C (rs2227306) on CFX384 Touch Real Time PCR Detection System. Complete blood count with blood smear, level of creatinine and C-reactive protein (CRP) levels were determined in accordance with generally accepted standard methods. The study group included 65 patients with CDI, and 65 healthy volunteers.

The second study entitled "Clostridium difficile caused changes in FAs profile and resolvin D1 (RvD1) content in plasma of infected patients" assessed FA content in the plasma of patients with CDI and healthy controls with use of gas chromatography. RvD1 content in the plasma were analyzed using an ELISA competitive assay. Complete blood count with blood smear, level of CRP levels were determined in accordance with generally accepted standard methods. The study group included 40 patients with CDI and 40 healthy volunteers.

The third study entitled "The level of fecal calprotectin significantly correlates with *Clostridium difficile* infection severity" assessed the benefit of FC testing in assessing the severity of CDI using immunoassay test. A retrospective analysis of demographic and clinical data as well as blood laboratory results (blood count, GFR-glomerular filtration rate, level of creatinine, albumin and CRP) were performed. Complete blood count with blood smear, level of creatinine, albumin, and CRP levels were determined in accordance with generally accepted standard methods. The study group included 76 patients with CDI.

## **Bioethics**

Informed written consent of the participants were obtained for the studies, the work was carried out on the basis of the approval of the Bioethical Committee of the Jagiellonian University Collegium Medicum, numbers: KBET/196/B/2011, KBET/207/B/2014, KBET/6/B/2014, 1072.6120.51.2018. The tests were carried out in accordance with the Helsinki Declaration.

## **Results**

In the first study it was shown that the polymorphisms IL-1 $\beta$  +3953 A/G (rs1143634), -31 A/G (rs1143627) and IL-8 +781 T/C (rs2227306) did not have an effect on the incidence of CDI and the disease recurrence. But it was found that there is a statistically significant

correlation between the number of WBC and neutrophils with the presence of the IL-8 +781 T/C (rs2227306) polymorphism ( $p=0.007$ ,  $p=0.03$ ; respectively). Patients with the TC variant were characterized by a significantly higher number of WBC and neutrophils when compared to patients with the TT variant ( $13.2$  vs  $6.2 \times 10^3/\mu\text{l}$  and  $9.0$  vs  $4.0 \times 10^3/\mu\text{l}$ ; respectively). In terms of CDI grading, when patients were divided into either severe CDI or non-severe CDI, it was demonstrated that patients with T/C SNP variant IL-8 +781 had a statistically significant increase in the incidence of severe CDI ( $p=0.03$ ). No such correlations were observed for IL-1 $\beta$  SNPs +3953 A/G (rs1143634) and -31 A/G (rs1143627).

In the second study it was found that the plasma SFA (saturated fatty acids) index (36.2%) was statistically higher in the plasma of CDI patients, compared with control (27.0%,  $P < 0.001$ ). Statistically significant differences between groups were noted for C14:0, C15:0, C16:0 and C17:0. Total plasma n-6 acids were similar in both groups (23.8% for control and 25.5% for CDI). Total n-3 acids were statistically lower in the plasma of patients with CDI as compared with the control group (7.8 and 19.4%,  $p < 0.001$ ). In the CDI group, it was observed decreased of C18:3 n-3 levels when compared with the control group (1.9 vs 10.7%,  $p < 0.001$ ). The plasma n-3/n-6 ratio was statistically significantly decreased (almost three-fold) in patients with CDI (ratio 0.4) compared with the control group (ratio 1,1). Elongase activities (calculated as C18:0/C16:0) and delta 6 desaturase (calculated as C18:3 n-6/C18:2 n-6) activities were significantly lower in CDI group ( $p=0.01$  and  $p=0.001$ , respectively). RvD1 concentration was significantly higher in the control group compared with patients who had CDI ( $162 \pm 52$  vs  $132 \pm 42$  pg/mL, respectively;  $p=0.02$ ).

In the third study it was found that the median level of FC was typical for people with colitis (739  $\mu\text{g/g}$ ,  $Q_{25}$ - $Q_{75}$  612–799  $\mu\text{g/g}$ ). A statistically higher FC concentration was observed in the severe vs non-severe CDI (severe 770 vs non-severe 659  $\mu\text{g/g}$ ;  $p=0.009$ ). The evaluation of patients with CDI showed 20 deaths among the 76 people, 13 of which originated directly from CDI — sequentially or clinically. In the remaining 7 cases, the CDI had been successfully treated with death attributed to different mechanisms. The mortality rate was 17% ( $n = 13/76$ ) where death was directly attributed to CDI and 26% ( $n = 20/76$ ) where all deaths were included. Where CDI was the contributing factor, the time from diagnosis to death averaged 10 days (1–22 days). In the remaining 7 cases that timeframe was 36 days (21–45 days). There was no significant difference in FC level between group with no CDI-related deaths and those with CDI-related deaths. However, significantly higher values of WBC ( $13.7$  vs  $8.04 \times 10^3/\mu\text{l}$ ;  $p=0.03$ ), creatinine (163 vs 85  $\mu\text{mol/l}$ ;  $p=0.004$ ), and CRP 198 vs 51 mg/l;  $p < 0.001$ ) and a lower GFR (37 vs 74 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>;  $p=0.002$ ), and albumin (24 vs 29 g/l;  $p=0.009$ ) were observed in people who had died than in those who had survived

CDI. The last test was designed to determine whether the calprotectin concentration correlates with the assessed blood parameters and we found only one such correlation - between FC and platelets ( $r=0.28$ ;  $p=0.02$ ).

### **Conclusions**

1. The first study indicates that the presence of IL-8 +781 T/C is associated with the severe CDI. The presence of the IL-1 $\beta$  +3953 A/G, -31 A/G and IL-8 +781 T/C genetic polymorphisms does not have a role in the development or recurrence of CDI.
2. The second study found that there are distinct changes in plasma FA during CDI. In the case of patients with a good outcomes, it was probably observed the effective resolution of inflammation, as reflected in n-3 FA metabolism and its significant decrease in relative to the control group.
3. The third study found that FC is an indication of ongoing intestinal inflammation in CDI patients. The FC levels significantly correlated with CDI severity, which shows it could prospectively serve as a predictive marker for assessing CDI severity. The ongoing search for CDI severity markers is particularly vital, enabling fast and optimal treatment approach, which is crucial in CDI therapy.