

O C E N A**Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna**

Pani mgr Izabeli Kubiszewskiej

” Wpływ bakterii kwasu mlekowego na reakcje odpornościowe indukowane przez
H. pylori na modelu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jacek Michałkiewicz

Promotor pomocniczy: dr Lidia Gackowska

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy nr 17/2015 z dnia 20.01.2015 r. o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, zgodnie z art. 13 i 14 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14.03.2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm. w Dz.U. z 2005 r. Nr 164 poz. 1365) mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Przedłożona do oceny praca obejmuje łącznie 141 stron tekstu, w tym 106 stron stanowi sama rozprawa. Rozprawa ma układ klasyczny, z czytelnym podziałem na rozdziały i podrozdziały wyszczególnione w spisie treści; przed spisem treści zamieszczony został „Wykaz najważniejszych skrótów używanych w pracy”. Poszczególne rozdziały mają następujące proporcje: Wstęp – 18 stron, Cel pracy – 2 strony, Materiał i Metody – 13 stron, Wyniki – 49 stron, Dyskusja – 13 stron, Wnioski – 1 strona, Streszczenie, w języku polskim 3 strony i angielskim – 2 strony. W pracy umieszczono 41 tabel i 22 ryciny. Bibliografia, ułożona w kolejności cytowania, zawiera 250 pozycji; poza 9 publikacjami w języku polskim pozostałe są w języku angielskim; wśród nich blisko 40% stanowią publikacje z ostatniego dziesięciolecia.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego

2. poprawności metodycznej
3. znaczenia naukowego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.
4. Redakcji przedłożonej pracy

1. Wartość celu badawczego

Helicobacter pylori jest gram-ujemną bakterią, rozpowszechnioną na świecie z dużym zróżnicowaniem geograficznym. W krajach rozwijających się ok. 80% populacji przed 20 rokiem życia zostaje zakażone tym patogenem, natomiast w krajach rozwiniętych częstość występowania *H. pylori* nie przekracza 40% populacji i przeważają osoby dorosłe.

Obecność *Helicobacter pylori* zwiększa ryzyko choroby wrzodowej żołądka lub dwunastnicy jak również raka żołądka. Jednakże u większości zakażonych osób choroba nie rozwija się; wysunięto wiele hipotez wyjaśniających ten fakt, ale żadna z nich nie uzyskała powszechnej aprobaty.

We wstępie do rozprawy Doktorantka przedstawiła charakterystykę zakażenia *Helicobacter pylori*, przebieg kliniczny zakażenia (infekcja *H. pylori* ma charakter przewlekły i często przebiega bezobjawowo), odpowiedź immunologiczną na zakażenie *H. pylori* (w tym aktywację mechanizmów nieswoistych odpowiedzi immunologicznej, oddziaływanie patogenu z profesjonalnymi komórkami żernymi, aktywację komórek tucznych i NK oraz indukcję dojrzewania komórek dendrytycznych, a także odpowiedź swoistą przeciwko *Helicobacter pylori*).

Doktorantka przedstawiła doniesienia na temat roli limfocytów T regulatorowych (Treg), które przez wspieranie intensywnej kolonizacji żołądka przez *H. pylori* uczestniczą w uszkodzeniu śluzówki żołądka pacjentów, a także szczegółowo omówiła prezentację antygeny w zakażeniu *H. pylori*, indukcję miejscowej jak i systemowej odpowiedzi humoralnej (w tym aktywację limfocytów B) w wyniku zakażenia.

W kolejnej części pracy doktorantka wyczerpująco opisała elementy przewodu pokarmowego zasiedlane przez mikrobiota oraz działanie prawidłowej mikroflory jelitowej człowieka, a także przedstawiła gatunki z rodzaju *Lactobacillus* dominujące w błonie śluzowej przewodu pokarmowego (*L. plantarum*, *L. rhamnosus* oraz *L. paracasei* ssp. *paracasei*).

Doktorantka przedstawiła definicję, rys historyczny znaczenia słowa „probiotyki” oraz omówiła rolę bakterii kwasu mlekowego (LAB) i ich zastosowania jako probiotyku. Po omówieniu probiotyków doktorantka zwróciła uwagę na szereg zagadnień związanych z korzystnym wpływem bakterii kwasu mlekowego na *Helicobacter pylori* (w tym aktywacji

przeciwbakteryjnych właściwości bakterii lub ich produktów, umożliwiających zwalczanie patogenu oraz zmniejszanie niepożądanych skutków eradykacji poprzez ochronny wpływ probiotyków na mikroflorę przewodu pokarmowego). W dalszej części wstępu doktorantka przedstawiła stymulację odpowiedzi immunologicznej przez bakterie kwasu mlekowego, ich wpływ na komórki nabłonka oraz aktywację mechanizmów odpowiedzi nieswoistej. W tabeli doktorantka zawarła dane na temat wpływu probiotyków na funkcje odpornościowe (z uwzględnieniem odpowiedniego piśmiennictwa).

W kolejnej części wstępu doktorantka opisała modulację adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej przez bakterie kwasu mlekowego.

Doktorantka podkreśliła, że nadal pomimo wielu badań przyczyna zróżnicowanego profilu zapalenia błony śluzowej w zakażeniu *H. pylori* nie jest znana oraz że nie wiadomo, dlaczego pomimo indukowania silnej reakcji prozapalnej nie dochodzi do eliminacji zakażenia, a w niektórych przypadkach infekcja prowadzi do objawowego zapalenia śluzówki żołądka o różnym przebiegu. W oparciu o literaturę medyczną doktorantka wysunęła hipotezę, że skojarzone działanie bakterii mikroflory (w tym LAB) oraz pałeczek *H. pylori* wpływa na określony profil systemowej odpowiedzi immunologicznej na te drobnoustroje. Ze względu na fakt, iż z powodów etycznych badanie tej odpowiedzi u ludzi jest ograniczone, Doktorantka podjęła się oceny *in vitro* poprzez badanie reaktywności populacji komórek jednojądrzastych uzyskanych z krwi (PBMC) w odpowiedzi na stymulację przez pałeczki *H. pylori* oraz LAB lub kombinację tych bakterii, co byto możliwe ze względu na fakt, że zarówno pałeczki *H. pylori* jak i LAB reprezentują bakterie mikroflory jelitowej i istnieje określony, osobnizo zmienny, poziom systemowej odpowiedzi anamnesticznej limfocytów na te drobnoustroje.

Celem pracy była ocena zdolności wyselekcjonowanych, wykazujących odmienne zdolności blokowania wzrostu *H. pylori* (antagonizmu bakterii względem *H. pylori*) szczepów bakterii kwasu mlekowego do modulacji *in vitro* odpowiedzi immunologicznej jednojądrzastych komórek krwi obwodowej PBMC (ang. peripheral blood mononuclear cells) stymulowanej *Helicobacter pylori*. Oceny dokonano poprzez:

1. Analizę proliferacji PBMC po stymulacji bakteriami kwasu mlekowego oraz porównanie wpływu bakterii kwasu mlekowego (LAB) na proliferację komórek indukowanych *H. pylori*;
2. Ocenę zdolności do modulowania syntezy cytokin PBMC stymulowanych *H. pylori* oraz porównanie profilu cytokin pro- i przeciwzapalnych indukowanych LAB o odmiennym antagonizmie względem *H. pylori*;
3. Porównanie różnic fenotypowych monocytów krwi obwodowej po indukcji bakteryjnej w układzie pojedynczych bakterii oraz ich kompozycji;

4. Próbę oceny immunomodulującego wpływu LAB w układzie z *H. pylori* na takie parametry odpornościowe jak: proliferacja subpopulacji limfocytów krwi obwodowej (limfocytów T pomocniczych, limfocytów T cytotoksycznych oraz limfocytów B), generowanie limfocytów T regulatorowych Treg oraz indukowanie apoptozy komórek.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

W badaniu doktorantka zastosowała *Helicobacter pylori* CagA+ szczep 25A oraz szczepy bakterii kwasu mlekowego. W badaniach zastosowano dodatkowo dostępny na rynku preparat probiotyczny TRILAC stanowiący kompozycję trzech szczepów kwasu mlekowego, w równych proporcjach: *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* LbY-27, *Bifidobacterium bifidum* BB-12 R oraz *Lactobacillus acidophilus* La-5R.

Doktorantka w swoich badaniach zastosowała 2 szczepy bakterii kwasu mlekowego:

L. plantarum szczep 0862 (szczep antagonistyczny wobec *H.pylori*) oraz *L. plantarum* szczep 0864 (szczep nieantagonistyczny wobec *H.pylori*). Badania antagonizmu bakterii kwasu mlekowego wobec *H. pylori* wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej (dzięki uprzejmości prof. dr hab. Zdzisławy Libudysz). Badano 32 różne szczepy pałeczek kwasu mlekowego, z których wybrano 2 w/wymienione szczepy do badań opisanych przez doktorantkę w pracy.

W badaniach doktorantka zastosowała żywe szczepy *L. plantarum* (zgodnie z definicją probiotyku) w stężeniach wywołujących optymalną stymulację odpowiedzi immunologicznej. Materiał do badań stanowiły komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (limfocyty i monocyty) tzw.: PBMC (ang. peripheral blood mononuclear cells) uzyskane w wyniku izolacji z 20 ml krwi pełnej lub masy leukocytno-płytkowej. Materiał biologiczny pochodził od 60 zdrowych dawców krwi z Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Bydgoszczy oraz Poradni Medycyny Pracy w Szpitalu Uniwersyteckim im. A. Jurasza w Bydgoszczy.

Doktorantka określała reaktywność PBMC w odpowiedzi na stymulację przez pałeczki *H. pylori* oraz szczepy kwasu mlekowego (odpowiednio *L. plantarum* szczep antagonistyczny względem *H. pylori* oraz *L. plantarum* szczep nieantagonistyczny wobec *H. pylori*) jak również w odpowiedzi na mieszaninę trzech szczepów kwasu mlekowego zawartych w preparacie probiotycznym TRILAC (antagonistycznym wobec *H. pylori*) oraz pałeczki *H. pylori* w kombinacji z w/wymienionymi szczepami kwasu mlekowego.

Badania doktorantka prowadziła w hodowlach 7-dniowych (odpowiedź swoista limfocytów T na antygeny mikroflory) oraz w hodowlach 3-dniowych (poliklonalna aktywacja limfocytów T stymulowanych via receptor CD3).

Komórki stymulowano optymalnymi dla proliferacji dawkami bakterii oraz badano odpowiedź proliferacyjną komórek (test transformacji blastycznej komórek) według ustalonego schematu. Ocenę transformacji blastycznej limfocytów oznaczano metodą radioizotopową. Przeprowadzono oznaczanie poziomów cytokin (IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IL-23, IL-27) w nadsączach z nad hodowli PBMC zgodnie ze starannie przedstawionym przez doktorantkę schematem wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA. Analizę badania markerów powierzchniowych, apoptozy, oraz odpowiedzi proliferacyjnej populacji komórkowych wykonano po stymulacji bakteryjnej przy użyciu cytometru przepływowego wg schematu opisanego szczegółowo przez doktorantkę..

Badania były prowadzone w ramach projektu finansowanego ze środków stypendialnych w ramach projektu „Krok w przyszłość- stypendia dla doktorantów III edycja” dla doktorantów kształcących się na kierunkach uznanych za szczególnie istotne z punktu widzenia rozwoju województwa kujawsko pomorskiego w roku akademickim 2010/2011 (Nr umowy: SP III 4345-1-189-3040-616/10)

Zgodnie z założeniami projektu badania miały charakter prospektywny.

Metodyka badań została opisana przez Doktorantkę w sposób świadczący o jej dużej wiedzy teoretycznej oraz znajomości zasad pracy laboratoryjnej. Syntetycznie przedstawione zostały wykorzystane techniki laboratoryjne oraz metody badawcze. Bardzo ważną część stanowi statystyczne opracowanie uzyskanych wyników z wykorzystaniem odpowiednio dobranych testów i analiz.

Podsumowując stwierdzam, że zarówno plan pracy, jak i zastosowana metodyka badań oraz metody analizy statystycznej spełniają wszystkie kryteria dobrej praktyki klinicznej.

2.2 Wyniki

Jednym z najważniejszych celów projektu było wykazanie, czy wybrane szczepy LAB różnią się w zakresie modulacji niektórych reakcji odpornościowych indukowanych in vitro przez pałeczki *H. pylori* na modelu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) zdrowych dawców krwi. Wstępny etap stanowiło porównanie 2 pojedynczych szczepów *L. plantarum* wykazujących przeciwstawne właściwości w badaniu mikrobiologicznym względem *H. pylori* (tj. antagonistyczne i nieantagonistyczne) oraz preparatu probiotycznego TRILAC (o

działaniu antagonistycznym), zawierającego trzy szczepy LAB Zastosowanie wymienionego schematu badań miało na celu określenie korzystnych z punktu widzenia stymulacji odpowiedzi immunologicznej cech, którymi powinien charakteryzować się szczep LAB o potencjalnych właściwościach probiotycznych. Wyjściowym parametrem immunologicznym, który doktorantka brała pod uwagę jako wskaźnik indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej PBMC, była odpowiedź **proliferycyjna limfocytów**. Doktorantka wykazała, że badane szczepy LAB, pałeczki *H. pylori* oraz *H. pylori* w kombinacji z LAB nie różniły się znacząco w zakresie indukcji proliferacji swoistej w hodowlach 7-dniowych. Badane szczepy LAB nie zmieniały także znacząco proliferacji indukowanej przez pałeczki *H. pylori*. Przeciwnie, doktorantka wykazała, że pałeczki *H. pylori* oraz szczepy kwasu mlekowego w kombinacji z *H. pylori* silnie blokowały proliferację nieswoistą limfocytów, stymulowanych przeciwciałami anti-CD3, z czego najsilniejszy efekt supresyjny indukowany był przez kombinację *H. pylori* ze szczepem nieantagonistycznym *L. plantarum* szczep 0864, a najslabszy z preparatem probiotycznym TRILAC.

Supresja proliferacji dotyczyła limfocytów T CD4+, a w przypadku *H. pylori*, *L. plantarum* szczep 0864 i kombinacji *H. pylori* ze szczepami *L. plantarum*, również limfocytów T cytotoksycznych (CD8+). Doktorantka wykazała, że supresja proliferacji związana była ze spadkiem ekspresji szeregu cząsteczek adhezyjnych i kostymulacyjnych monocytów, zaangażowanych w przekazywaniu sygnału II aktywacji limfocytów T, lecz nie ze wzrostem populacji limfocytów Treg lub apoptozą komórek.

Kolejnym zagadnieniem podjętym przez doktorantkę była ocena wpływu kwasu mlekowego na profil cytokin produkowanych przez PBMC indukowanych bakteriami *H. pylori*.

Badane przez doktorantkę szczepy kwasu mlekowego oraz pałeczki *H. pylori* indukowały silną odpowiedź cytokinową w populacji PBMC (w tym badane bakterie kwasu mlekowego indukowały wysoki poziom IFN-gamma oraz IL-12p40, ale stosunkowo niski poziom IL-10, z wyjątkiem preparatu badanego TRILAC, który był silnym stymulatorem tej cytokiny).

Doktorantka wykazała, że najbardziej charakterystycznym efektem kombinacji *H. pylori* oraz szczepów LAB w układzie odpowiedzi swoistej było zmniejszanie indukowanej LAB produkcji IL-12p40, przy wzroście produkcji IL-10. Efekt ten był najslabszy w kombinacji *H. pylori* /TRILAC.

Należy w tym miejscu podkreślić, że dotychczasowe badania nie rozstrzygnęły, w jaki sposób aktywacja przez bakterie kwasu mlekowego zmienia reaktywność cytokinową komórek na stymulację *H. pylori*, a praca doktorantki jest w tym względzie pionierska.

Doktorantka wykazała, że profil odpowiedzi cytokinowej indukowanej przez szczepy LAB wskazuje na zdolność tych bakterii do silnej modulacji szeregu mechanizmów odpornościowych gospodarza, a tym samym, na przynajmniej częściową modulację odpowiedzi na *H. pylori*.

Uzyskane przez doktorantkę wyniki wskazują również, że zastosowany w badaniu preparat probiotyczny składający się z trzech szczepów kwasu mlekowego znacząco zmniejszał tolerogenne działanie *H. pylori* poprzez ograniczenie hamowania produkcji IFN- γ oraz IL-12p40) przy jednoczesnym utrzymaniu aktywności przeciwzapalnych (IL-10 oraz IL-27).

Cele pracy zrealizowano z wykorzystaniem różnorodnych testów statystycznych, w tym między innymi charakterystyki rozkładu badanych zmiennych za pomocą średniej, odchylenia standardowego, mediany oraz kwartyli. Do testowania różnic pomiędzy grupami zastosowano testy U Mana-Whitney'a (w porównaniach dwóch grup) oraz ANOVA rang Kruskala Wallisa (dla więcej niż 2 porównywanych grup). Różnicę pomiędzy pomiarami danej zmiennej przeprowadzono za pomocą testu kolejności par Wilcoxon.

Wyniki zostały zilustrowane licznymi, znakomitymi rycinami.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała wszystkie założone cele badawcze. Uzyskane wyniki stały się podstawą do sformułowania w pełni uprawnionych wniosków, które doktorantka zawarła w odpowiednich podpunktach po ocenie poszczególnych zaplanowanych parametrów badawczych oraz po dyskusji.

3. Wartość naukowa i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

Obecność *Helicobacter pylori* zwiększa ryzyko wystąpienia zapalenia żołądka typu B (mogącego prowadzić do powstania nowotworu) i wrzodów trawiennych. Jednakże u większości zakażonych osób choroba nie rozwija się; a przyczyna tego nie jest znana. Pomimo wielu hipotez nadal nie jest jasne dlaczego pomimo indukowania silnej reakcji prozapalnej nie dochodzi do eliminacji zakażenia, a w niektórych przypadkach infekcja prowadzi do objawowego zapalenia śluzówki żołądka o różnym przebiegu. Ponieważ istnieją hipotezy mówiące, że znaczącą rolę w kontrolowaniu reakcji odpornościowych na zakażenie *H. pylori* odgrywa mikroflora jelitowa, która kontroluje profil reaktywności komórek układu odpornościowego, doktorantka podjęła się ambitnego zadania oceny zdolności wyselekcjonowanych, wykazujących odmienne zdolności blokowania wzrostu *H. pylori* szczepów bakterii kwasu mlekowego do modulacji reakcji odpornościowych indukowanych przez pałeczki *H. pylori*.

Nie ulega wątpliwości, że wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu przyczyniły się nie tylko do istotnego wzbogacenia wiedzy o roli mikroflory jelitowej, w tym pałeczek kwasu mlekowego – lactobacilli (LAB) w kontrolowaniu profilu reakcji odpornościowych na zakażenie *H. pylori*, ale również będą miały zastosowanie w praktyce, zwłaszcza dzięki ocenie probiotyku (badany przez doktorantkę preparat TRILAC) i jego właściwościach zmniejszenia tolerogenicznego działania *H. pylori* poprzez ograniczenie hamowania produkcji IFN- γ oraz IL-12p40 przy jednoczesnym utrzymywaniu aktywności przeciwzapalnych (IL-10 oraz IL-27). Ten watek opracowania jest szczególnie istotny dla gastroenterologów, bowiem rekomenduje stosowanie probiotyku u pacjentów zakażonych *Helicobacter pylori*.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka wykazała się zarówno dużą wiedzą teoretyczną, jak i praktyczną umiejętnością zastosowania odpowiednich metod badawczych. Dokonała umiejętnej analizy wyników własnych, przeprowadziła wnikliwą i dojrzałą dyskusję z wykorzystaniem właściwie dobranego piśmiennictwa oraz odniosła się krytycznie do ograniczeń wynikających z zastosowanych metod badawczych.

Mam nadzieję, że najbliższych planach Doktorantki jest przygotowanie publikacji w dobrych czasopismach zagranicznych, ponieważ uzyskane przez nią wyniki są nie tylko interesujące, ale mają też charakter pionierski.

4. Redakcja przedłożonej pracy

Omawiana praca doktorska stanowi przykład spójnej, niezwykle starannie przygotowanej dokumentacji naukowo-badawczej. Przejrzyste tabele i znakomite ryciny stanowią jej mocną stroną. Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy. Praca zawiera drobne błędy stylistyczno-ortograficzne (np. już na stronie tytułowej drobny błąd Wydział Farmaceutyczny zamiast Farmaceutyczny), jednak te drobne błędy absolutnie nie obniżają wartości pracy i nie powinny wpłynąć na jej ogólną ocenę.

WNIOSKI KOŃCOWE

Biorąc pod uwagę aspekt naukowy pracy, w tym nowatorskie podejście, wartość merytoryczną projektu i staranną szatę graficzną oceniam pracę jako w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom **na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna** określone art. 13 i 14 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14.03.2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm. w Dz.U. z 2005 r. Nr 164 poz. 1365).

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy z wnioskiem o dopuszczenie mgr Izabeli Kubiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, doceniając walory naukowo-poznawcze pracy oraz staranność i nowatorskie podejście w prowadzeniu badań, jak również praktyczne znaczenie uzyskanych wyników i wniosków z ogromną przyjemnością stawiam **wniosek o wyróżnienie**.

Warszawa, 12 lutego 2015 r.

Prof. nadzw. dr hab. n. med. Irena Jankowska

217465 6 Prof. nadzw. dr hab. n. med.
Irena Jankowska
Pediatra, Gastrolog
Transplantolog, Kliniczny