

Dr hab. Henryk W. Witas  
Zakład Biologii Molekularnej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
ul. Narutowicza 60  
90-136 Łódź

**Ocena**  
**pracy doktorskiej mgr Izabeli Kubiszewskiej**  
**pt.**  
**„Wpływ bakterii kwasu mlekowego na reakcje odpornościowe**  
**indukowane przez *H. pylori* na modelu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej”**

Modyfikacja znanych i wprowadzanie nowych metod immunologii i biologii molekularnej dostarczają coraz dokładniejszych danych o mechanizmach rządzących procesami fizjologicznymi, a uzyskana wiedza umożliwia wprowadzanie doskonalszych algorytmów postępowania klinicznego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Izabeli Kubiszewskiej jest dobrym przykładem nowoczesnego sposobu rozwiązywania problemu badawczego. Autorka podjęła się wyjaśnienia mechanizmu modulowania przez niektóre szczepy bakterii mlekowych reakcji odpornościowej gospodarza indukowanej pierwotnie obecnością pałeczek *H. pylori*. Badania zostały przeprowadzone *in vitro* z udziałem izolowanych limfocytów i monocytów krwi obwodowej zdrowych dawców. Stawiając sobie ten ambitny cel, mgr Kubiszewska zaplanowała m.in. ustalenie wartości szeregu parametrów opisujących nieswoistą i swoistą odpowiedź immunologiczną na infekcję pałeczką *H. pylori* oraz zcharakteryzowanie szczepów z rodzaju *Lactobacillus* i ich przydatność w terapii jako czynnika probiotycznego.

Pragnę w tym miejscu podkreślić, że oceniana przeze mnie, zaawansowana metodycznie i organizacyjnie, praca powstała w zespole naukowym kierowanym przez doświadczonego naukowca prof. dr hab. Jacka Michałkiewicza i jest dobrą wizytówką Katedry i Zakładu Immunologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy.

Tekst ocenianej pracy liczy 134 strony maszynopisu, z czego ostatnie 24 strony Autorka poświęciła na cytowane piśmiennictwo. Praca zawiera 22 rysunki, w tym 20 histogramów, i 41 tabel. Piśmiennictwo obejmuje 250 pozycji, z których 36 pochodzi z ostatnich 5 lat. Układ pracy jest charakterystyczny dla prac eksperymentalnych, obejmuje część teoretyczną, omówienie grup badanych, opis stosowanej metodyki badawczej, omówienie wyników, ich dyskusję i streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca zakończona jest sześcioma, rozbudowanymi w formie, podsumowującymi wnioskami. Strona graficzna została opracowana starannie.

W części teoretycznej rozprawy zamieszczonych jest pięć bloków tematycznych ilustrowanych jedną zbiorczą tabelą. W pierwszym rozdziale Doktorantka zdefiniowała zakażenie *H. pylori*. W dwóch kolejnych scharakteryzowała, odpowiednio, nieswoistą i swoistą odpowiedź immunologiczną na infekcję pałeczką. W czwartym rozdziale przedstawiła cechy bakterii kwasu mlekowego, a w piątym przedstawiła dostępne dane na temat oddziaływania bak-

terii mlekowych na *H. pylori* i zastosowanie w terapii probiotykami uwzględniając stymulację odpowiedzi immunologicznej, wpływ na komórki nabłonka oraz aktywację odpowiedzi nieswoistej i modulowanie adaptacyjnej.

Należy podkreślić obszernie i przejrzyste uzasadnienie podjętych badań, których celem było ustalenie wpływu bakterii *H. pylori* na profil odpowiedzi immunologicznej, limfocytów i monocytów izolowanych z krwi obwodowej, modulowanej obecnością bakterii kwasu mlekowego *in vitro*. Badania przeprowadzono używając szczepu *H. pylori* CagA<sup>+</sup> oraz dwóch szczepów bakterii kwasu mlekowego – o działaniu antagonistycznym i nieantagonistycznym.

Doktorantka określała następujące parametry odpowiedzi immunologicznej:

1. proliferację PBMC w układzie odpowiedzi:
  - a) antygenowo-swoistej (hodowle 7-dniowe), po stymulowaniu PBMC bakteriami kwasu mlekowego, bakteriami *H. pylori*, oraz mieszaniną tych bakterii,
  - b) antygenowo-nieswoistej, tj. poliklonalnej aktywacji limfocytów indukowanych przeciwciałami anti-CD3 (induktor komórek T) i stymulowanych bakteriami według schematu jak wyżej,
2. profil syntezy cytokin po stymulacji PBMC bakteriami według schematu jak wyżej,
3. fenotyp monocytów krwi obwodowej po ich aktywacji bakteriami według schematu jak wyżej,
4. wpływ bakterii kwasu mlekowego i *H. pylori* na proliferację subpopulacji limfocytów krwi obwodowej (limfocytów T<sub>pom.</sub> i T<sub>cyt</sub> oraz limfocytów B), generowanie limfocytów T<sub>reg</sub> oraz indukcję apoptozy komórek.

W rozbudowanej części metodycznej Autorka opisuje stosowany materiał biologiczny, tj. pochodzenie i sposób identyfikacji bakterii szczepu 25A *H. pylori* syntezującego białko wirulentności CagA, pochodzenie stosowanych przez nią szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i stosowany preparat probiotyczny TRILAC. W dalszej części rozdziału poświęconego metodyce Autorka szczegółowo przedstawia sposób weryfikowania właściwości szczepów *Lactobacillus* w procesie hamowania wzrostu *H. pylori* i wskazuje dwa, spośród 32 testowanych, wybrane do dalszych badań. Izolowanie PBMC z krwi pełnej i masy leukocytarnopłytkowej oraz szczegółowe warunki 3 i 7 dniowych hodowli PBMC, w tym skład poszczególnych wariantów hodowlanych oraz parametry radioizotopowej metody oceny transformacji blastycznej są przedmiotem kolejnego podrozdziału. Dalej Autorka przedstawia kolejno procedury identyfikowania i oznaczania cytokin uwalnianych do środowiska, w którym hodowano PBMC po 72 godzinnej stymulacji bakteryjnej. Fenotyp infekowanych komórek, wartość apoptozy i odpowiedzi proliferacyjnej to kolejne, z bardzo bogatego panelu, parametry oceny odpowiedzi immunologicznej na infekcję pałeczkami *H. pylori* modyfikowaną obecnością bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Omówienie testów statystycznych stosowanych przez Autorkę dopełnia część metodyczną pracy.

38 stronicowy rozdział poświęcony wynikom pracy jest bogato ilustrowany 18 diagramami i 38 tabelami prezentującymi szczegółowo uzyskane dane.

Sposób w jaki Doktorantka uzyskiwała dane nie budzi w zasadzie zastrzeżeń. Jednak charakterystyka materiału biologicznego, który był używany do badań jest niewystarczająca. Okre-

ślenie „*Material biologiczny pochodził od zdrowych dawców krwi...*” nie wyczerpuje niezbędnej charakterystyki w przypadku używania go do przedstawianego w pracy spektrum oznaczeń. Nic nie wiadomo o istotnym dla przeprowadzanych badań statusie immunologicznym dawców. Być może brak takiej informacji jest tylko przeoczeniem edytorskim.

Głównym założeniem, które przyświecało Doktorantce podczas planowania eksperymentów i które stanowi o wartości przedstawionej do recenzji pracy, było ustalenie takich warunków eksperymentu *in vitro*, które pozwalają ocenić oddziaływanie różnych bakterii na komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej. Skład PMBC wyizolowanych od dawców, tj. ok. 80% limfocytów i 20% monocytów, sprzyja testowaniu efektu oddziaływania poszczególnych, stosowanych w pracy, szczepów bakterii bądź niezależnie od siebie bądź jednocześnie, i ocenie szeregu parametrów opisujących ich rolę oraz wpływ na kształtowanie profilu odpowiedzi immunologicznej. Warto nadmienić, że przeprowadzenie podobnego eksperymentu w warunkach *in vivo* klóciłoby się z zasadami etyki.

Obszerna prezentacja danych ułatwia ich interpretację. I tak, stosując zróżnicowaną metodykę, Doktorantka uzyskała wyniki, które wskazują na to, że:

1. choć stosowane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Helikobacter* tylko w niewielkim stopniu stymulują proliferację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej to jednak szczepy bakterii mlekowych decydują o znacznej supresji rodzaju odpowiedzi proliferacyjnej w układzie stymulacji poliklonalnej, a supresja nie jest związana ani z limfocytami T<sub>reg</sub> ani z procesem apoptozy,
2. wspomniana supresja odpowiedzi proliferacyjnej dotyczy komórek CD4<sup>+</sup>, choć Doktorantka stwierdza, że oddzielnie *H. pylori* i jeden ze szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*L. plantarum* 0864), a także obydwa rodzaje bakterii infekujące jednocześnie, hamują również odpowiedź komórek CD8<sup>+</sup>,
3. wszystkie szczepy z rodzaju *Lactobacillus* stymulują prozapalną odpowiedź badanych komórek i uwalniają IL-12, TNF- $\alpha$  oraz IFN- $\gamma$ , w przeciwieństwie do infekujących pałeczek *H. pylori*, które stymulują ich odpowiedź przeciwapalną (IL-10). *H. pylori* modulują fenotyp jednojądrzastych komórek krwi obwodowej indukowanych poliklonalnie w obecności *H. pylori*. Profil syntezowanych cytokin w czasie odpowiedzi swojej określają jednak pałeczki *H. pylori*.
4. obecność wszystkich stosowanych podczas realizacji pracy bakterii hamuje ekspresję receptorów związanych z aktywacją i prezentacją antygenów na powierzchni monocytów, przy czym pałeczki *H. pylori* i preparat TRILAC należą do czynników najsilniej oddziałujących.

Zarówno część metodyczna pracy, która świadczy o swobodnym posługiwaniu się nowoczesnym, różnorodnym metodycznie warsztatem badawczym, jak i dyskusja przedstawionej mi do recenzji pracy, stanowiąca przegląd aktualnej wiedzy w temacie, świadczą o dojrzałości Autorki w konstruowaniu i realizowaniu koncepcji naukowych. W dyskusji Autorka posługu-

je się swobodnie aktualną literaturą obszernie ją cytując. Sądzę, że z pożytkiem dla transparentności pracy, szczególnie w jej części podsumowującej uzyskane wyniki, byłoby przedstawienie proponowanych mechanizmów i zależności w formie schematów, które zawsze stanowią dobrą ilustrację uzyskanych danych.

Autorka, niestety, nie zamieściła wykazu publikacji przygotowanych w oparciu o uzyskane wyniki, których jest autorem lub współautorem. W związku z tym nie mogę ustosunkować się w niniejszej recenzji do Jej dokonań na polu publikacyjnym. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki stanowią zbiór, poprawnie opracowany, które po wprowadzeniu niezbędnego formatowania i korekty edytorskiej można przygotować do publikacji, o ile Doktorantka już tego nie dokonała.

Staranność i dbałość o stronę edycyjną tekstu rozprawy pozostawia nieco do życzenia, co nie umniejsza wartości merytorycznej pracy. Podpisy tabel i diagramów nie wyczerpują oczekiwanej treści i nie zawierają zadeklarowanych oznaczeń. Cechą wspólną podpisów tabel 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39 są pierwsze dwa słowa „Porównanie poziomów...”, przy czym w żadnym podpisie nie zaznaczono jednostek, które opisywałyby liczby umieszczone w tabeli. Raz określenie „poziom” odnosi się do zjawiska proliferacji innym zaś razem do jednej z badanych interleukin. Podobnie wszystkie podpisy tabel 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 zaczyna sformułowanie „Analiza statystyczna poziomów istotności (wartość p) ...” odpowiedzi proliferacyjnej lub stężenia. Trudno w prosty sposób wyjaśnić wspomniane sformułowanie, a w związku z tym, czytając każdą z wymienionych tabel, trudno się zorientować czego dotyczy liczby w niej zawarte. Nie wyjaśniono w opisie metody liczenia w konkretnym przypadku (rodzaj stosowanego testu statystycznego) ani nie przekierowano do właściwego miejsca w tekście.

Sądzę, że wprowadzenie poprawek nie powinno stanowić problemu, a ich znaczna liczba jest zapewne podyktowana pośpiechem podczas przygotowania pracy do druku.

Wykaz niektórych spośród znajdujących się w tekście nieścisłości redakcyjnych i edycyjnych pozwoliłem sobie zamieścić w osobnym załączniku do niniejszej recenzji.

Przytoczone uwagi i sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy oraz mojej pozytywnej opinii o pracy doktorskiej mgr Izabeli Kubiszewskiej. Rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim stanowiąc całościowe i kompetentne potraktowanie stawianego sobie celu. Recenzowana praca zawiera elementy nowości naukowej a uzyskane dane stanowią efekt wyboru i zastosowania właściwych metod badawczych.

Uwzględniając koncepcję badawczą i wartość poznawczą, jakie wnoszą uzyskane wyniki, przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie mgr Izabeli Kubiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Lódź, dnia 26 marca 2015 r.

K I E R W I T A S  
ZAKŁADU BIOLOGII MOLEKULARNEJ  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Prof. nadzw. dr hab. Henryk W. Witas

ZAŁĄCZNIK DO RECENZJI

Wykaz niektórych tylko niezręcznych sformułowań w tekście dostrzeżonych podczas zapoznawania się z rękopisem pracy, których poprawienie nie powinno nastężyć Autorce trudności.

Uwagi ogólne

Tytuł pracy jest jej wizytówką i powinien zawierać istotne elementy przedstawiając je lapidarnie, w sposób zrozumiały. Moim skromnym zdaniem tytuł mógłby brzmieć „*Wpływ bakterii kwasu mlekowego na odpowiedź immunologiczną jedojądrczastych komórek krwi obwodowej indukowanych in vitro pałeczką H. pylori*”. Wydaje się, że działanie immunomodulacyjne, tym bardziej *in vitro*, dotyczy komórek, a nie modelu, jak to sugeruje tytuł pracy. Komórki, które stosowała Doktorantka nie były modelem, były jak najbardziej prawdziwe. Modelowy jest układ, który tworzy szereg obiektów, poddawany działaniu czynników od wewnątrz lub z zewnątrz.

Często, niezbyt zręcznie, Autorka używa następujących określeń:  
*izolacja* – jeżeli oznacza czynność, a nie przedmiot (rzeczownik) to lepiej używać formy rzeczownikowej czasownika - *izolowanie*; podobnie *stymulacja* – *stymulowanie*, *modulacja* – *modulowanie* itd.

Trudno zrozumieć dlaczego Doktorantka używa określenia *kompozycja* zamiast *skład mieszaniny* lub po prostu *mieszanina*.

Ekwilibrystykę językową, podobną do treści jednego z punktów w części przedstawiającej cel pracy – „*Porównanie różnic fenotypowych monocytów krwi obwodowej po indukcji bakteryjnej w układzie pojedynczych bakterii oraz ich kompozycji*”, można spotkać wielokrotnie w tekście całej pracy. Czy mogą być porównywane różnice fenotypowe? Albo, co oznacza sformułowanie „*indukcja w układzie kompozycji*”? „*Skład*” jest dobrym, polskim odpowiednikiem angielskiego „*composition*”. Czy nie byłoby zręczniejsze napisać np. *Ocena cech fenotypowych monocytów krwi obwodowej i ocena różnic fenotypowych wynikających z indukowania jednym rodzajem lub mieszaniną różnych rodzajów bakterii*?

„... *indukowanie bardziej protekcyjnych reakcji odpornościowych ..*” s. 104, 9 w. od góry – bez komentarza.

„*W pracy wykorzystano model badawczy, w którym oceniano profil ...*” może raczej „*Zastosowano model badawczy, który pozwolił ocenić profil ...*”

„*Wyjściowym parametrem immunologicznym brany pod uwagę...*” (s. 90 w. 14 od góry). Cóż to jest wyjściowy parametr? Może Autorce chodziło po prostu o „*Parametr immunologiczny, który początkowo brano pod uwagę?*”

„... *spodziewać się można wyższej odpowiedzi proliferacyjnej ...*” (s. 91, w. 8 od góry). Czy odpowiedź proliferacyjna może być wyższa lub niższa jak np. brzoza? Może raczej „*wzmoczona*” lub „*ograniczona*”?

„*W literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu na odpowiedź immunologiczną bakterii kwasu mlekowego, szczególnie w układzie badań in vitro podjętym w niniejszej pracy badawczej*”. (s. 91 w. 10 od dołu). Może raczej „*W literaturze tematu można znaleźć tylko niewiele danych opisujących wpływ bakterii kwasu mlekowego na jakość odpowiedzi immunologicznej, szczególnie w warunkach in vitro, jak to opisano w niniejszej pracy*”.

„*Wpływ bakterii kwasu mlekowego na profil cytokin produkowanych przez PBMC indukowane bakteriami H. pylori*” może zręczniejsze byłoby - „*Wpływ bakterii kwasu mlekowego na zmianę profilu cytokin syntezowanych przez PBMC indukowanych pałeczkami H. pylori*”.

Często myśl zawartą w skomplikowanym wyrażeniu, np. „*Uzyskane wyniki odpowiedzi proliferacyjnej po indukcji szczepami bakteryjnymi wykazały niewielkie zdolności bakterii do stymulacji proliferacji komórek w badanych układzie in vitro*.” (s. 90, w. 14 od dołu) – można ująć prościej i bardziej przyjaźnie dla czytelnika – *Ocena odpowiedzi proliferacyjnej komórek indukowanych szczepami bakteryjnymi wykazała niewielką ich zdolność do stymulowania proliferacji in vitro*.

„*Podobne, niskie wartości proliferacji PBMC po indukcji Gram-dodatnimi bakteriami probiotycznymi uzyskano już wcześniej w innych pracach [199]*.” (s. 90, w. 8 od dołu). Może lepiej brzmi – „*Podobną, ograniczoną znacznie proliferację PBMC indukowaną probiotycznymi bakteriami Gram-dodatnimi obserwowali inni autorzy [199]*”.

Co oznacza wyrażenie –„... zaobserwowano znamienne statystycznie podniesienie odpowiedzi proliferacyjnej PBMC...” (s. 90, w. 5 od dołu) – może autorce chodziło o „znamienne statystycznie wzrost wartości odpowiedzi proliferacyjnej” ?

„... szczepy LAB wykazały istotną statystycznie indukcję proliferacji w porównaniu do komórek kontrolnych...”  
– statystycznie istotna lub nieistotna może być wartość lub różnica w odpowiedzi proliferacyjnej, a nie indukcja proliferacji – zjawisko nie może być statystycznie znamienne lub nieznamienne!