

Prof. dr hab. n. med. Leokadia Bąk-Romaniszyn
Zakład Żywienia w Chorobach Przewodu Pokarmowego
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
ul. Rzgowska 281/289
Tel. 42 2711388
e-mail; leokadia.bak-romaniszyn@umed.lodz.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Elizy Mnich p.t. „Oddziaływania
Helicobacter pylori z komórkami gospodarza i ich rola w rozwoju reakcji zapalnej
i odpornościowej”.**

Duży postęp w gastroenterologii, mikrobiologii, immunologii w ciągu ostatnich dziesięcioleci pozwolił na poznanie wielu ważnych zjawisk w złożonej patofizjologii żołądka i dwunastnicy. Odkrycie *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) i jej roli w etiopatogenezie zapalenia błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej, raka czy chłoniaka żołądka w istotny sposób zmieniło postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne w tych chorobach.

Bakteria *H.pylori* została uznana przez WHO za czynnik karcinogeny klasy I. Ewolucja zmian w błonie śluzowej od zakażenia człowieka *H.pylori* do rozwoju wrzodu w trwa latami, a raka czy chłoniaka żołądka nawet dziesiątki lat.

Rozpowszechnienie *H.pylori* jest duże, dotyczy zarówno dzieci, jak i osób dorosłych. W krajach wysoko rozwiniętych zakażonych *H.pylori* jest 15% dzieci, 40% dorosłych a w krajach rozwijających się odpowiednio 80% i 100%. W Polsce przeciętnie, prevalencja *H.pylori* wynosi 32% u dzieci i 70 - 80% u osób dorosłych.

Początek zakażenia, zwykle jest mało charakterystyczny, trudny do uchwycenia. U większości osób immunologicznie kompetentnych zakażenie przebiega bezobjawowo, stymulując tylko powstanie swoistej odporności komórkowej i humoralnej. Pomimo silnego odczynu zapalnego w błonie śluzowej zasiedlonej przez *H.pylori* u większości chorych nie dochodzi do eliminacji bakterii z organizmu, a zapalenie przybiera postać przewlekłą.

Bakteria *H.pylori* wykazuje zróżnicowanie budowy genowej. Przyjmuje się, że zróżnicowanie antygenowe szczepów *H.pylori*, może warunkować przebieg kliniczny zakażenia. Nadal mało jest informacji dotyczących oceny powiązań między czynnikami cytotoksycznymi bakterii, a morfologicznymi wykładnikami zakażenia *H.pylori* w błonie śluzowej żołądka. Znaczenie odpowiedzi immunologicznej zarówno swoistej, jak i nieswoistej w patogenezie chorób żołądka i dwunastnicy w następstwie zakażenia *H.pylori*

nie zostało również jednoznacznie określone. Przewlekły charakter zakażenia *H.pylori* oraz odległe następstwa długotrwałego zakażenia u ludzi, pod postacią rozrostu nowotworowego w żołądku, wskazują na potrzebę prowadzenia kompleksowych badań nad przebiegiem zakażenia *H.pylori*.

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorantka podjęła się oceny skutków oddziaływania wybranych, dobrze scharakteryzowanych antygenów *H.pylori* z komórkami gospodarza w rozwoju reakcji zapalnej i odpornościowej.

W szczegółowych celach Doktorantka podjęła się próby poznania;

1. Roli antygenów *H.pylori* w zaburzeniu hemostaz bariery nabłonkowej żołądka.
2. Interakcji LPS *H.pylori* z makrofagami stanowiącymi ogniwo odporności nieswoistej gospodarza, za pośrednictwem receptorów lektynowych.
3. Wyznaczników reakcji zapalnej w modelowym zakażeniu *H.pylori* u kawii domowych.

Doktorantka założyła, że;

- skutki oddziaływania *H.pylori* na komórki gospodarza zależą od natury antygeny, jego stężenia, mechanizmu działania, typu komórek docelowych oraz czasu ich ekspozycji na komponenty bakteryjne, oraz

- dominacja określonych antygenów w środowisku może determinować przebieg zakażenia, towarzyszącej mu reakcji zapalnej i odpornościowej, a także procesów patologicznych.

Badania realizowała *in vitro* na zdefiniowanych modelach kolonii komórkowych oraz *in vivo* na modelu doświadczalnego zakażenia *H.pylori* u kawii domowych.

Przedłożona do oceny dysertacja „ma nowy układ” dla prac doktorskich – przygotowana jest zgodnie z nowelizacją Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 18 marca 2011 roku (art. 13, ustęp 2). Trzon pracy stanowi zbiór 4 oryginalnych artykułów spójnych tematycznie i 1 pogładowej, opublikowanych w renomowanych recenzowanych czasopismach naukowych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączny wskaźnik Impact Factor prezentowanych publikacji wynosi 9,843 pkt a punktacja MNiSW 100.

Przedstawiona do oceny praca liczy 215 stron tekstu. Podzielona jest na kilka działów zawierających prezentację dorobku naukowego Doktorantki, źródła finansowania badań, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody badawcze, zamiast wyników pełne kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, dyskusje, podsumowanie wyników, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo i aneks. Posiada również wykaz skrótów zastosowanych w pracy.

Dorobek doktorantki jest imponujący; obejmuje łącznie 14 publikacji pełno tekstowych o łącznym IF 23,995 pkt, MNSiW 264 pkt oraz 54 doniesienia zjazdowe o zasięgu międzynarodowym i krajowym.

Interesujący wstęp zawarty na 24 stronach stanowi szerokie omówienie historii odkrycia bakterii *Helicobacter* i jej związku z zapaleniem błony śluzowej żołądka, jak również przegląd wiedzy o *H. pylori*, jej wirulencji, miejscowym i uogólnionym mechanizmie oddziaływania na organizm gospodarza, metodach diagnostyki i leczenia zakażenia. Ta część przedstawiona została w sposób jasny i klarowny, świadczący o dobrej znajomości poruszanych przez Doktorantkę zagadnień.

W rozdziale materiał i metody badawcze Doktorantka dokonała charakterystyki badanych zwierząt z podziałem na analizowane podgrupy, antygenów EG wzorcowego szczepu *H.pylori* CCUG17874, białek, toksyn, przeciwciał, linii komórkowych nabłonka żołądka i fibroblastów kawii czy komórek linii monocytarno-makrofagowej używanych w badaniach, stosowanych testów i metod badawczych oraz analiz statystycznych.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane i omówione szczegółowo we wskazanych publikacjach w recenzowanych czasopismach naukowych. Ponadto oddzielnie przedstawione zostało podsumowanie wyników każdej z prac oraz ich interpretacja.

W badaniach *in vitro* Doktorantka wykazała;

- nasilenie migracji i proliferacji, i przyspieszone gojenia komórek nabłonka żołądka i fibroblastów przez rozpuszczalne białko CagA, podjednostkę UreA ureazy oraz antygeny powierzchniowe *H.pylori* zawarte w EG użyte w wybranych doświadczalnie stężeniach oraz nasilenie gojenia komórek nabłonkowych żołądka po ekspozycji na LPS *H.pylori* użyty w niskim stężeniu (1ng/ml),

- hamowanie migracji i proliferacji komórek nabłonka oraz fibroblastów, i gojenia komórek nabłonka żołądka po ekspozycji na LPS *H.pylori* użyty w wysokim stężeniu (25 ng/ml) oraz ich związek z uszkodzeniem DNA, zaburzeniami materiału genetycznego, cyklu komórkowego, zmianami nekrotycznymi, obniżeniem stężenia EGF i ufosforylowanej cząsteczki sygnałowej STAT3,

- zależną od fukozy interakcję LPS *H.pylori*/ determinanty Le^{x/y+} z lektynowym receptorem rozpuszczalnym DC-SIGN oraz receptorem DC-SIGN-podobnym na komórkach THP-1 linii monocytarno-makrofagowej poddanych różnicowaniu w środowisku PMA, IL-4, GM-CSA,

-zależną od galaktozy interakcję LPS *H.pylori* bez determinantów Le^{x/y} z receptorem rozpuszczalnym DC-SIGN oraz receptorem DC-SIGN-podobnym na komórkach linii monocytarno-makrofagowej poddanych różnicowaniu THP-1.

W badaniach *in vivo* u kawii domowych wykazała;

- rozwój przewlekłej reakcji zapalnej w błonie śluzowej żołądka po 28 dniach od ekspozycji na pałeczki *H.pylori* podane drogą przewodu pokarmowego,

- lokalizację w węzłach chłonnych krezki antygenowo-swoistych limfocytów T o fenotypie CD4+, proliferujących i zdolnych do wytwarzania IFN- γ w hodowlach *in vitro* w odpowiedzi na antygeny EG *H.pylori*.

- brak ekspresji prozapalnej IL-1 β w węzłach chłonnych krezki zwierząt zarażonych *H.pylori*,

- nasilenie ekspansji limfocytów T pozyskiwanych ze śledziony kawii zarażonych *H.pylori* hodowanych wspólnie z monocytami pulsowanymi antygenami UreA lub CagA *H.pylori* i ich prawdopodobny związek ze zdolnością niedojrzałych makrofagów do prezentacji antygenów i podwyższonym stężeniem IFN- γ w hodowlach

oraz

- zahamowanie ekspansji limfocytów T pozyskiwanych ze śledziony kawii hodowanych wspólnie z makrofagami pulsowanymi LPS *H.pylori* i prawdopodobny związek LPS *H.pylori* z zaburzeniem dojrzewania makrofagów i zdolności prezentacji antygenów, uszkodzeniem ich DNA oraz wzrostem stężenia TGF- β w hodowlach makrofagów z autologicznymi limfocytami,

Wartość merytoryczna załączonych prac nie budzi zastrzeżeń, przeszły one ocenę recenzentów indeksowanych czasopism naukowych, co już jest potwierdzeniem i uznaniem ich wartości naukowej.

Dyskusja, w której Doktorantka umiejętnie konfrontuje wyniki własne z doniesieniami z piśmiennictwa liczy 20 stron. Tekst jest napisany poprawnym językiem.

Wnioski sformułowane przez Doktorantkę dowodzą słuszności hipotez stawianych przez Doktorantkę i Zespół Badawczy w którym pracuje.

Autorka wykorzystała 294 pozycje piśmiennictwa właściwe pod względem tematycznym co świadczy, że była dobrze przygotowana teoretycznie do realizacji postawionego zadania badawczego. Piśmiennictwo napisane jest w kolejności cytowania, |z dobrze przestrzeganą konsekwencją interpunkcyjną i bibliograficzną.

Uwaga redakcyjna; w podanych wieloautorskich pozycjach piśmiennictwa można, co się zwykle czyni, ograniczyć liczbę wymienianych nazwisk do np. trzech.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że w przedstawionej mi do recenzji pracy kierunek zaprogramowanych badań odpowiada w pełni potrzebom pogłębiania i aktualizacji wiedzy na temat patomechanizmów procesu zapalnego w zakażeniu *Helicobacter pylori* i poznawania modelu odpowiedzi obronnej organizmu na zakażenie.

Program badawczy zaplanowany został wielopłaszczyznowo, a następnie konsekwentnie realizowany. Praca jest wartościowym opracowaniem, które wykazało na modelach komórkowych *in vitro* i na modelu zakażenia u kawii *in vivo*, że skutki oddziaływania *H.pylori* na komórki gospodarza zależą od antygeny, jego stężenia, mechanizmu jego oddziaływania (cytotoksyczny/genotoksyczny/immunoregulatorowy), typu komórek docelowych oraz czasu ich ekspozycji na antygeny bakteryjne oraz mogą utrzymywać reakcje zapalne, zaburzać procesy regeneracyjne tkanek i nasilać mutacje.

Reasumując stwierdzam, że powierzona mi do oceny rozprawa pt. „Oddziaływania *Helicobacter pylori* z komórkami gospodarza i ich rola w rozwoju reakcji zapalnej i odpornościowej” jest oryginalnym dorobkiem naukowym Doktorantki i spełnia warunki stawiane pracom doktorskim.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Elizy Mních do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Elizy Mních.

Łódź, 5 stycznia 2017 r.

Prof. dr hab. n. med. Leokadia Bąk-Romaniszyn

Zakład Żywienia
w Chorobach Przewodu Pokarmowego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
93-338 Łódź, ul. Rzgowska 281/298
tel. 42 271 13 88

KIEROWNIK
Zakładu Żywienia
w Chorobach Przewodu Pokarmowego
Katedry Gastroenterologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
L. Bąk-Romaniszyn
prof. dr hab. n. med. Leokadia Bąk-Romaniszyn