



Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Adriana Łukasza Gajewskiego****„Współdziałanie antygenów *Helicobacter pylori*, czynników pokarmowych, farmakologicznych i endogennych gospodarza w rozwoju i kontroli reakcji zapalnej na poziomie bariery nabłonkowej żołądka i śródbrłnka naczyń krwionośnych”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 176 stron maszynopisu. Ma charakter monografii o układzie typowym dla prac doświadczalnych i w pełni odpowiada warunkom wymaganym do rozprawy doktorskiej.

Rozdział **Wstęp** to bardzo zwięzłe lecz zarazem wyczerpujące wprowadzenie w tematykę pracy. Autor przedstawił w nim czynniki ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca, zwracając uwagę na sugerowany związek między przewlekłymi zakażeniami bakteryjnymi i rozwojem zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych.

Wśród drobnoustrojów, których materiał genetyczny wykryto w blaszce miażdżycowej wymieniane są bakterie *Helicobacter pylori* a u osób zakażonych tą bakterią odnotowano podwyższony poziom surowiczej lipoproteiny LDL, odpowiedzialnej za transport cholesterolu na obwód i uważanej za jeden z najważniejszych czynników ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Co więcej, wieloletnie doustne przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego przez pacjentów leczonych z powodu tej choroby może prowadzić do uszkodzenia nabłonka żołądka, co jest szczególnie istotne dla pacjentów dodatkowo zakażonych *Helicobacter pylori*. Doktorant w zwięzły sposób omówił także czynniki wirulencji tych drobnoustrojów (wyróżniając ureazę, białko CagA związane z cytotoksyną oraz lipopolisacharyd) a także wybrane endogenne czynniki prozapalne, których nadprodukcja może przyczyniać się do rozwoju patologicznej reakcji zapalnej.

Przytoczone przez Autora dane statystyczne z 2017r o odpowiedzialności choroby niedokrwiennej za 45% zgonów na kontynencie europejskim a także sięgający 80% w Polsce odsetek osób zakażonych *Helicobacter* świadczą o wadze podjętej tematyki.

Do wymienionych przez Autora licznych czynników sprzyjających rozwojowi choroby niedokrwiennej serca został zaliczony również rozwój w okresie płodowym oraz urodzeniowa masa ciała. Chciałabym prosić Doktoranta o rozwinięcie tego tematu. Chciałabym również poprosić o wyjaśnienie, czy dostępne są badania na modelu zwierzęcym świadczące o połączeniu między zakażeniem *Helicobacter* a chorobą niedokrwienną serca.



W osobnym rozdziale Doktorant przedstawił założenia pracy, zgodnie z którymi, u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, towarzyszący chorobie podwyższony poziom produktów oksydacji cholesterolu oraz przyjmowany kwas acetylosalicylowy mogą modulować rozwój reakcji zapalnej wywołanej zakażeniem *Helicobacter*.

Celem pracy była odtworzenie *in vitro* warunków, jakim są poddawane komórki nabłonka żołądka i śródbłonka naczyń u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, zakażonych *Helicobacter* i identyfikacja mechanizmów działania rozpuszczalnych komponentów *Helicobacter pylori* w indukcji miejscowej reakcji zapalnej.

Rozdział **Materiały i metody** zawiera opis stosowanych w pracy linii komórkowych, antygenów bakteryjnych, stymulatorów, przeciwciał oraz testów handlowych do oznaczeń apoptozy lub cytokin w supernatantach pochodzących a także odczynników chemicznych, roztworów buforowych oraz sprzętu laboratoryjnego. Ambitne cele pracy zostały zrealizowane dzięki zastosowaniu szerokiego zakresu metod pozwalających określić wpływ badanych komponentów *Helicobacter* oraz stosowanych stymulatorów na żywotność komórek, ich aktywację oraz zdolności regeneracyjne. Metody zostały opisane w sposób umożliwiający zrozumienie ich zasady oraz odtworzenie doświadczenia. Należy podkreślić uzupełnienie opisu metod przez umieszczenie bardzo starannie przygotowanych przez Doktoranta rycin pomocniczych. **W opisie białek rekombinowanych przydałaby się informacja o ich aktywności biologicznej a także o składzie ekstraktu glicynowego.**

W trzech podrozdziałach przedstawiono wyniki kompleksowych badań wpływu wybranych komponentów *Helicobacter* (LPS, rekombinowanych form ureazy i białka CaqA oraz zawierającego te komponenty białkowe – ekstraktu glicynowego) na nabłonek żołądka, śródbłonek naczyń oraz towarzyszące rozwojowi reakcji zapalnej komórki immunokompetentne. W pracy badano ich działanie na:

- a. stabilność bariery komórek nabłonkowych żołądka oraz bariery śródbłonka naczyń
- b. aktywację komórek nabłonkowych żołądka, komórek śródbłonka oraz leukocytów
- c. mechanizmy naprawcze tych komórek.

Dodatkowo, oceniono również wpływ środowiska hodowli wzbogaconego o kwas acetylosalicylowy oraz 7-ketocholesterol (ASA/7-kch) na reakcję komórek badanych linii. Wyniki zostały udokumentowane w postaci przejrzystych rycin i zdjęć.

Przeprowadzone doświadczenia potwierdzają założoną hipotezę badawczą. Zostały one przedstawione w sposób bardzo jasny i logiczny. Doktorant wykazał, iż:

- a. rozpuszczalne komponenty bakterii *H. pylori* hamując aktywność metaboliczną komórek nabłonka żołądka, nasilając stres oksydacyjny oraz indukując proces apoptozy mogą przyczyniać się do naruszenia integralności bariery nabłonkowej żołądka
- b. zaburzenie jej integralności może również umożliwić kontakt bakterii *Helicobacter* i ich komponentów z komórkami śródbłonka naczyń, prowadząc do zaburzenia funkcjonowania bariery śródbłonka i w konsekwencji – do reakcji ogólnoustrojowej



- c. kontakt komórek nabłonkowych żołądka oraz komórek śródbłonka naczyń z komponentami *Helicobacter* może pobudzać je do syntezy/wydzielania czynników stymulujących rozwój reakcji zapalnej i przyciąganie do miejsca reakcji komórek immunokompetentnych. Ich niekontrolowana aktywacja może przyczynić się do nasilenia reakcji zapalnej. Bardzo ciekawa jest obserwacja wzmożonej po wpływie komponentów *Helicobacter* ekspresji cząsteczki ICAM-1 na komórkach śródbłonka (co może sprzyjać ich oddziaływaniu z komórkami immunokompetentnymi) oraz jej obniżonej syntezy w obecności kwasu acetylosalicylowego i 7-ketocholesterolu
- d. kontakt komórek nabłonkowych żołądka oraz komórek śródbłonka naczyń z komponentami *Helicobacter* zaburza ich zdolności regeneracyjne, a przy nasilonej apoptozie - pogłębia zmiany patologiczne.
- e. obecność w środowisku hodowli kwasu acetylosalicylowego oraz 7-ketocholesterolu nasila działanie komponentów *Helicobacter*.

Przeprowadzone badania wskazują również, iż wpływ na hodowane komórki często miało wzbogacenie podłoża hodowlanego o kwas acetylosalicylowy i 7-ketocholesterol. Chciałabym prosić Doktoranta o informację, czy dodatek kwasu acetylosalicylowego w stosowanej dawce może wpływać na pH podłoża? Czy były podejmowane próby badania odpowiedzi komórek nabłonka żołądka na komponenty *Helicobacter* w warunkach niskiego pH, charakterystycznego dla środowiska w żołądku oraz odpowiedzi komórek śródbłonka w warunkach obniżonego pH, charakterystycznego dla warunków „infection/inflammation”?

Bardzo dobrze i ciekawie napisana Dyskusja obejmuje 16 stron. Autor omówił w niej otrzymane wyniki i przedstawił główne wnioski, odnosząc je do właściwie dobranych danych literaturowych, podkreślając potencjalny wpływ obserwowanych reakcji na rozwój choroby niedokrwiennej serca. Autor zwrócił m.in. uwagę na większą oporność komórek śródbłonka na cytotoksyczne działanie komponentów *H. pylori*, wpływ komórek immunokompetentnych na nasilenie stresu oksydacyjnego i możliwość wzmożonego oddziaływania leukocytów z komórkami nabłonka żołądka i śródbłonka u osób zakażonych *H. pylori*. Doktorant podkreślił także - w kontekście rozwoju zmian nowotworowych - możliwość korzystnego działania środowiska zawierającego kwas acetylosalicylowy i 7-ketocholesterolu przez hamowanie aktywności proliferacyjnej komórek nabłonka żołądka oraz - w kontekście tworzenia blaszki miażdżycowej- nasilonej proliferacji komórek śródbłonka pod wpływem IL-33 w warunkach symulujących zakażenie *Helicobacter* u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca.

Bibliografia obejmuje 215 pozycji. Strona edytorska i językowa pracy została przygotowana bardzo starannie.

Rozprawę kończy rozdział, w którym przedstawiony został wart podkreślenia - bogaty dorobek naukowy Doktoranta obejmujący 13 publikacji naukowych i popularnonaukowych, 29 doniesień konferencyjnych, wykaz odbytych staży naukowych, realizowanych projektów naukowych oraz zdobytych nagród i wyróżnień. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż Doktorant uzyskał finansowanie swych badań w ramach programu Preludium Narodowego Centrum Nauki.

**BiolMed**93-232 Łódź
ul. Lodowa 106tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wkład pracy Doktoranta w wykonanie części eksperymentalnej, analizę i interpretację wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

dr hab. Anna Świerzko, prof. IBM PAN