

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ LEKARSKI

KLINIKA IMMUNOLOGII I ALERGII

Prof. dr hab. n. med. Janina Łucja Grzegorzcyk

Główny specjalista ds. badań laboratoryjnych

ul. Pomorska 251 bC5
92-213 Łódź
tel.: +48 42 272 53 77
e-mail: janina.grzegorzcyk@umed.lodz.pl

Łódź 21.03.2019

RECENZJA PRACY
NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Mgr ADRIANA ŁUKASZA GAJEWSKIEGO

z Pracowni Gastroimmunologii

Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej

Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i immunologii

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytetu Łódzkiego.

pt.” Współdziałanie antygenów *Helicobacter pylori*, czynników pokarmowych, farmakologicznych i endogennych gospodarza w rozwoju oraz kontroli reakcji zapalnej na poziomie bariery nabłonkowej żołądka i śródbłonna naczyń krwionośnych.

Zapalenie jest głównym elementem patogenezы wielu chorób. Spośród wielu czynników indukujących proces zapalny, istotną rolę odgrywają drobnoustroje. Reakcja zapalna spowodowana infekcją – wspólnie z dietą bogatą w tłuszcze zwierzęce – sprzyjają tworzeniu się złogów miażdżycowych. Pobudzone komórki układu odpornościowego znajdujące się w krążeniu, docierając do naczyń przenoszą substancje (kwasy tłuszczowe i szereg innych) odpowiedzialne za tworzenie się

blaszki miażdżycowej. Powstała blaszka jest modyfikowana przez zachodzące – na skutek infekcji - procesy immunologiczne. Stymulują one komórki zapalne i limfocyty do generowania cytokin i zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz uwalnianie czynników tkankowych. Kontakt ze strumieniem krwi aktywuje kaskadę krzepnięcia, skutkiem jest zmiana struktury blaszki miażdżycowej i powstawanie zakrzepów. Częste, nawracające infekcje przyspieszają proces miażdżycowy z uwagi na stany zapalne, które zapoczątkowują szereg procesów prowadzących do zmian w naczyniach.

Jako możliwe czynniki ryzyka miażdżycy naczyń rozważany jest udział zakażeń wywołanych *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) poprzez niszczenie śródbłonna naczyń. U dorosłego człowieka, śródbłonek naczyń stanowi istotny element zachowania homeostazy poprzez udział w utrzymaniu równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antykoagulacyjnymi czy powstawania nowych naczyń krwionośnych. Dysfunkcja śródbłonna spowodowana zachodzącą reakcją zapalną prowadzi do zaburzeń w układzie odpornościowym takich jak np. zwiększone wydzielanie pro-zapalnych cytokin i wzmożonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Skutkiem jest napływ komórek układu odpornościowego – makrofagów czy limfocytów - w miejsce zmienione miażdżycowo i powstawanie zmian chorobowych. Współczesny pogląd na rolę zakażeń bakteryjnych zakłada współdziałanie tychże w formowaniu miażdżycy poprzez niszczenie śródbłonna naczyń.¹ Badania Mendall i wsp. dotyczące oceny poziomu przeciwciał przeciwko antygenom *H.pylori*, zwróciły uwagę na rolę zakażeń *H.pylori* w rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Badacze zaobserwowali podwyższony poziom przeciwciał u chorych z chorobą wieńcową.² Inni wykryli DNA *H.pylori* w blaszkach miażdżycowych i wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1.³ Udowodniono, że komponenty *H.pylori* indukują ekspresję pro-zapalnej cyklooksygenazy COX-2 w wielu komórkach (limfocytach T, neutrofilach,

¹ Mateusz Tomczyk, Witold Nowak, Agnieszka Jaźwa.: Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. Postępy biochemii 59 (4) 2013; 357 - 364

² Mendall M.A i wsp.: Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. Heart J 71: 1994; 437 - 439

³ Ameriso SF i wsp. : Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. Stroke 32: 2001; 385-391

makrofagach), co prowadzi do wytwarzania silnie pro-zapalnych cytokin: IL-1, IL-8 czy TNF- α .

Częstotliwość zakażeń *H.pylori* oraz złożony patomechanizm choroby niedokrwiennej serca, skłoniły Doktoranta do postawienia hipotezy badawczej oraz podjęcia badań cyt. „ zamierzających do wyjaśnienia współdziałania tych drobnoustrojów w inicjowaniu i rozwoju reakcji zapalnej z poziomu błony śluzowej żołądka” – str. 35 przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Doktorant założył, że zakażeniu *H.pylori* i nasileniu reakcji zapalnej sprzyjać mogą oksydowane lipoproteiny w formie 7-ketocholesterolu dostarczane wraz z pożywieniem czy kwas acetylosalicylowy (ASA) stosowany profilaktycznie i do leczenia choroby niedokrwiennej serca. Z uwagi na mocno unaczynioną błonę podstawną żołądka, miejscowe uszkodzenie bariery nabłonka żołądka może prowadzić do oddziaływania tych czynników na naczynia krwionośne oraz naruszenia bariery śródbłonka naczyniowego z możliwością rozwoju ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (Ryc.5; str. 36). W rozwoju takiej reakcji uczestniczyć mogą zarówno mediatory uwalniane przez komórki obu barier jak i cytokiny wytwarzane przez komórki układu odpornościowego. Modulacja ich aktywności może skutkować rozwojem przewlekłej reakcji zapalnej i procesami patologicznymi.

Powyższe założenia były przesłanką do sformułowania przez Doktoranta ambitnego celu badań dotyczącego – Cyt.

„ oceny roli dobrze zdefiniowanych komponentów *H.pylori* takich jak ekstrakt glicynowy (GE, glycine extract), rekombinowana podjednostka ureazy – UreA, rekombinowane białko CagA (cytotoxin associated gene A protein) związane z cytotoksyną oraz lipopolisacharyd (LPS, lipopolisacharide), a także oksydowanej lipoproteiny w formie 7-ketocholesterolu i kwasu acetylosalicylowego stosowanego w leczeniu i profilaktyce ChNS , w kontekście rozwoju miejscowej reakcji zapalnej w nabłonku żołądka , która może przyczynić się do inicjacji i/lub utrwalenia ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i powiązanych z taką reakcją procesów patologicznych.” – str.37 rozprawy.

Do realizacji celu Doktorant zastosował model doświadczalny, w którym wykorzystał ludzkie komórki nabłonkowe żołądka AGS, komórki śródbłonka naczyń krwionośnych

HUVEC a także leukocyty krwi obwodowej zdrowych dawców i monocyty THP-1 eksponowane na wybrane komponenty *H.pylori* – GE, UreA, CagA LPS i/lub ASA oraz 7-kCh. Tak zaplanowany model doświadczalny obejmował cele cząstkowe dotyczące:

- Oceny stabilności bariery komórek nabłonkowych żołądka i śródbłonka naczyń krwionośnych na podstawie aktywności metabolicznej komórek, wyznaczników stresu oksydacyjnego: aktywnej mieloperoksydazy (MPO, *myeloperoxidase*), reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) oraz peroksydacji lipidów, apoptozy i przepuszczalności obu barier
- Oceny aktywności prozapalnej komórek nabłonkowych żołądka, śródbłonka naczyń krwionośnych oraz leukocytów krwi obwodowej zdrowych dawców z uwzględnieniem: ekspozycji cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ICAM-1, *intracellular adhesion molecule 1*), aktywacji ścieżki sygnałowej zależnej od STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), wydzielania cytokin pro-zapalnych: IL – 8, IL-33, czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , tumor necrosis factor α), IL-2, metaloproteinazy 9 (MMP-9, *matrix metalloproteinase 9*) oraz chemotaksji komórek immunokompetentnych.
- Oceny właściwości pro-regeneracyjnych komórek nabłonkowych żołądka i śródbłonka naczyń krwionośnych oraz ekspansji komórek immunokompetentnych na podstawie migracji i proliferacji – **str. 37** rozprawy.

Ocena układu pracy, struktury podziału treści kolejnych rozdziałów, kompletności tez.

Przedstawiona do recenzji rozprawa posiada typowy układ. Obejmuje – łącznie z tabelami i rycinami zawartymi w tekście oraz piśmiennictwem - 176 stron maszynopisu. **Wstęp** zawiera przegląd współczesnych danych dotyczących roli *H.pylori* w rozwoju choroby niedokrwiennej serca u podstaw, której leżą zmiany miażdżycowe oraz wpływu endogennych czynników pro-zapalnych takich jak stres oksydacyjny, enzymy proteolityczne, cytokiny, które to czynniki wpływają na aktywację komórek układu odpornościowego człowieka. Opisana też została rola - stosowanego profilaktycznie oraz w leczeniu – kwasu acetylosalicylowego. Zawarte w tym rozdziale istotne informacje świadczą o umiejętności autora w doborze oraz

korzystaniu ze współczesnego piśmiennictwa i stanowią dobre wprowadzenie w problematykę podjętą w badaniach.

Merytoryczna ocena pracy: Cel pracy został sformułowany przejrzysto a rozwiązanie postawionego problemu obejmowało 3 nurty badań laboratoryjnych (ujętych, jako cele szczegółowe na str.37).

Materiałem biologicznym do badań były:

- ludzkie komórki nabłonkowe raka żołądka linii AGS – American Type Culture Collection, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone
- ludzkie pierwotne komórki śródbłonka żyły pępowinowej linii HUVEC (C2517A) – Lonza, Walkersville, Maryland, Stany Zjednoczone
- ludzkie komórki monocytów krwi obwodowej linii THP-1 (ATCC[®], TIB-202[™]).

W szerokim rozdziale „**Materiały i metody**” zawarty został szczegółowy wykaz materiałów i aparatury, wykorzystywanych do przeprowadzenia badań oraz dokładny opis metod stosowanych do realizacji założonego celu:

- ✓ warunki hodowli i stymulacji komórek – str. 45-49
- ✓ ocenę aktywności metabolicznej komórek w teście redukcji MTT – str. 49-50
- ✓ identyfikację komórek ulegających apoptozie w teście TUNEL – str.50-51
- ✓ ocenę funkcji barierowej komórek na podstawie przepuszczalności dekstranu znakowanego fluorescencyjnie – str. 51-53
- ✓ ocenę migracji pro-regeneracyjnej komórek – str. 53 – 54
- ✓ ocenę wytwarzania przez komórki reaktywnych form tlenu – str.54-55
- ✓ ocenę aktywnej mieloperoksydazy – str. 55
- ✓ oznaczanie oksydowanych lipidów wewnątrzkomórkowych – str. 56-57
- ✓ ocenę ekspozycji cząsteczek adhezji międzykomórkowej ICAM-1 na powierzchni komórek – str. 57-58
- ✓ ocenę wydzielania przez komórki cytokin i mediatorów pro-zapalnych w teście ELISA – str. 58
- ✓ ocenę aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od STAT 3 – str. 59

Na stronach 60 – 65 opisane zostały metody izolacji leukocytów krwi obwodowej, oceny chemotaksji leukocytów krwi obwodowej, proliferacji komórek czy oceny wydzielania cytokin i wyznaczników stresu oksydacyjnego w ko-hodowlach AGS z leukocytami krwi obwodowej zdrowych dawców.

Niewątpliwą wartością tego rozdziału są także ryciny przedstawiające schemat postępowania w pozyskiwaniu komórek (Ryc.11- str.60); procedury do oceny chemotaksji (Ryc.12 – str.61) czy modelu *in vitro* mieszanych hodowli komórkowych w systemie dwukomorowym typu „*transwell*”. **Cały ten rozdział stanowić może bardzo dobry praktyczny przewodnik dla młodych adeptów nauki.**

Zwracają uwagę zastosowane bardzo nowoczesne i trudne metody badawcze. Wymagają „talentu laboratoryjnego” oraz pasji do prowadzenia badań naukowych, co zasługuje na szczególne podkreślenie. Nie bez znaczenia jest fakt, iż badania zostały przeprowadzone przez Doktoranta zgodnie z zasadą **GLP (Good Laboratory Practice)**.

Imponujący jest też rozdział „**Wyniki**”. Obejmuje 44 strony maszynopisu – w tym 23 ryciny a także zdjęcia z przeprowadzonych eksperymentów. Wobec tak szerokiego ujęcia problemu, obejmującego kilka wątków, pewną trudność w ocenie stanowi brak podsumowania wyników na poszczególnym etapie ich realizacji.

Pośród wielu interesujących wyników, na szczególną uwagę zasługują obserwacje dotyczące przepuszczalności bariery komórek nabłonkowych żołądka AGS i śródbłonka naczyniowego HUVEC. **Doktorant wykazał istotny wzrost przepuszczalności bariery komórek AGS dla dekstranu-FITC w czasie t_0 -120 minut, po stymulacji ASA/7-kCh lub samymi komponentami *H.pylori*: Ge, UreA, CagA, LPS i jej nasilenie w hodowlach traktowanych łącznie antygenami *H.pylori* i ASA/7-kCh. Podobnie, przepuszczalność bariery komórek śródbłonka naczyniowego była wyższa w porównaniu do komórek niestymulowanych. Przepuszczalność bariery śródbłonkowej ulegała dalszemu nasileniu w hodowlach traktowanych jednocześnie antygenami *H.pylori* i ASA/7-kCh. W tym miejscu powstaje pytanie czy i jakie znaczenie może posiadać taka obserwacja w rozwoju reakcji zapalnej u osób zakażonych *H.pylori* z chorobą niedokrwinną serca – proszę o komentarz.**

Ważnym spostrzeżeniem jest wykazanie wzrostu aktywnej formy MPO w ko-hodowlach komórek nabłonkowych AGS z leukocytami w odpowiedzi na GE czy CagA a także nasilenie wytwarzania ROS (str. 76) w porównaniu do hodowli samych komórek AGS. Również zastanawia słabsze wytwarzanie ROS przez leukocyty w porównaniu do komórek AGS.

Wytwarzanie ROS przez komórki jest jednym z istotnych elementów prawidłowego ich funkcjonowania w odpowiedzi na czynniki indukujące. Czyżby, zatem nasilenie procesu zapalnego w miazdżycy było wypadkową wzajemnych relacji pomiędzy aktywacją komórek nabłonkowych AGS a leukocytami?

Stymulacja komórek bodźcami endo- lub egzogennymi uruchamia szereg procesów w tym syntezę i wydzielanie cytokin, wpływa na ekspresję cząsteczek adhezyjnych, ale także proliferację lub apoptozę. Cytokiny wykazują właściwości plejotropowe; mogą oddziaływać na drodze autokrynej i parakrynej. W modelu doświadczalnym Doktorant wykazał istotny wzrost wydzielania IL-8 przez komórki AGS i HUVEC hodowane w środowisku z komponentami *H. pylori* w porównaniu do komórek hodowanych w medium. Natomiast zastanawiające i intrygujące są wyniki dotyczące zróżnicowanego - w zależności od komórki docelowej użytej w eksperymencie (AGS czy HUVEC) - wpływu ASA/7-kCh na wydzielanie tej cytokiny. Komórki AGS w obecności ASA/7-kCh poddane działaniu komponentów *H.pylori* wydzielały znacznie więcej IL-8 natomiast komórki HUVEC wydzielały mniej -str.92. Jak można wytłumaczyć zróżnicowany wpływ ASA/7-kCh na wydzielanie IL-8 w obecności komponentów *H.pylori*? Podobne pytanie odnosi się do wydzielania IL-33, TNF- α czy IL-2.

Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej wskazują na wielowątkowy i bardzo zróżnicowany wpływ komponentów *H.pylori* oraz innych czynników na rozwój oraz kontrolę reakcji zapalnej na poziomie bariery nabłonkowej żołądka i śródbłonna naczyń krwionośnych. Przeprowadzona przez Doktoranta dyskusja zawiera omówienie uzyskanych wyników, uwzględniając aktualną wiedzę. Doktorant z dużą erudycją cytuje piśmiennictwo w odniesieniu do własnych badań.

Uwagę przykuwają wyniki badań Doktoranta dotyczące zaburzeń integralności barier komórkowych i uszkodzenie tworzących je komórek, co może mieć kluczowe znaczenie w procesach patologicznych -zachodzących w nabłonku żołądka lub śródbłonku naczyniowym -związanych ze stresem, uszkodzeniem lub działaniem czynników zakaźnych oraz ich komponentów. Na szczególne podkreślenie zasługuje koncepcja prowadzonych doświadczeń, zastosowane metody badawcze i analityczne, wielowątkowe podejście do

rozwiązania postawionego celu naukowego. Sprawia to, że uzyskane wyniki badań są wiarygodne i nieprzypadkowe.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej mgr Adriana Łukasza Gajewskiego stwierdzam, że praca jest nowatorska a jej przedmiotem jest ważny poznawczo problem naukowy dotyczący współdziałania antygenów *H.pylori*, czynników pokarmowych, farmakologicznych i endogennych gospodarza w rozwoju oraz kontroli reakcji zapalnej na poziomie bariery nabłonkowej żołądka i śródbłonna naczyń krwionośnych. Zastosowany do badań nowoczesny model eksperymentalny – w oparciu o uzyskane wyniki - pozwolił na wyciągnięcie wniosku wskazującego na znaczenie rozpuszczalnych komponentów *H.pylori* w uszkodzeniu i promowaniu przewlekłej reakcji zapalnej zarówno na poziomie bariery komórek nabłonkowych żołądka, jak i śródbłonna naczyniowego a środowisko ASA/7-kCh nasila działanie tych komponentów. Może to sugerować, iż u osób zakażonych *H.pylori* czynniki te mogą modulować przebieg reakcji zapalnej w rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Z tej perspektywy badania mogą mieć ważny aspekt praktyczny a ich rozszerzenie na poziomie molekularnym pozwoli dogłębniej wyjaśnić mechanizmy komórkowe i być przyczynkiem do poszukiwania skutecznych, spersonalizowanych terapii.

Pragnę również podkreślić niezwykle elegancką formę edycji przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca stanowi nowoczesne ujęcie problemu i spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień dr nauk. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Adriana Łukasza Gajewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę oryginalność pracy, nowoczesne i świetne metodologicznie przygotowanie i opracowanie, stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. n. med. Janina Łucja Grzegorzcyk

Łódź, 21-03-2019

