

PAN = Instytut Immunologii
Wpł. dnia 02-10-2023
L.dz. 215



INSTYTUT „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

Warszawa, dn. 13.09.2023

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marceliny Pyclik

pt. „*Charakterystyka właściwości immunomodulujących B. longum spp. longum CCDM 7952 w leczeniu chorób o podłożu alergicznym*”

Choroby alergiczne stanowią obecnie jeden z ważniejszych problemów medycyny. Odsetek chorych w krajach europejskich sięga ok. 30-40% i ciągle wykazuje tendencję wzrostową. Najwięcej zachorowań występuje w dużych aglomeracjach miejskich i w krajach wysokorozwiniętych. Prognozy Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, iż utrzymanie się obserwowanego tempa przyrostu zachorowań spowoduje zrównanie populacji zdrowych z populacją osób chorych w 2025 roku, a badania epidemiologiczne przeprowadzone w Polsce umiejscawiają nasz kraj wśród społeczeństw o wysokiej zachorowalności na alergię. Kliniczna ekspresja chorób alergicznych zmienia się wraz z wiekiem i proces ten nazywamy „marszem alergicznym”. Marsz alergiczny to zmiana manifestacji narządowej alergii – najczęściej od alergii pokarmowej manifestowanej jako atopowe zapalenie skóry (AZS) poprzez alergiczny nieżyt nosa do astmy oskrzelowej włącznie oraz wygasania początkowego uczulenia na alergeny pokarmowe i narastanie uczulenia na alergeny powietrzno-pochodne. Szacuje się, że ok. 40% niemowląt chorujących na alergię pokarmową i AZS rozwinię do 3–4 r.ż. pełnoobjawową astmę oskrzelową, a przy obciążeniu rodzinnym chorobą atopową i współwystępowaniu nieżytu nosa/spojówek odsetek ten rośnie nawet do 80%.

Przyczyny wzrostu występowania alergii wiąże się z tzw. zachodnim stylem życia, czyli zwiększonym reżimem higienicznym, częstym stosowaniem antybiotyków, nielicznymi rodzinami, wzrostem liczby cięć cesarskich, zmianą nawyków żywieniowych (stosowanie żywności przetworzonej, półproduktów), urbanizacją i coraz mniejszym kontaktem z naturą.

Wymienione czynniki mają ogromny wpływ na skład mikrobioty jelitowej – uważanej obecnie za organ niezbędny do prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego i rozwoju tolerancji immunologicznej. Pomimo znacznych różnic indywidualnych mikrobiota jelitowa pacjentów z alergią jest odmienna od tej spotykanej u zdrowych i wykazuje szereg charakterystycznych cech, przede wszystkim jest mniej zróżnicowana, a u dzieci z alergią pokarmową obserwuje się opóźnioną w czasie i obniżoną liczebnie kolonizację *Bacteroidetes* oraz bakteriami z rodzaju *Bifidobacterium*. Dlatego uważam, że temat pracy związany z charakterystyką właściwości immunomodulacyjnych wybranego szczepu z gatunku *Bifidobacterium longum* podjęty przez Doktorantkę jest ważny i aktualny, szczególnie ze względu na możliwość zastosowania szczepów probiotycznych w leczeniu i/lub profilaktyce alergii.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest monografią charakteryzującą się typowym dla tego rodzaju prac układem. We wstępie Doktorantka uzasadnia motywy podjęcia pracy badawczej i na 34 stronach przeglądu piśmiennictwa przedstawia najnowsze badania dotyczące znaczenia mikrobioty jelitowej w rozwoju chorób alergicznych oraz w sposób wieloaspektowy analizuje dane dotyczące kształtowania mikrobioty, czynników wpływających na jej rozwój, mechanizmów reakcji alergicznej, znaczenia dysbiozy w indukowaniu procesów alergicznych oraz probiotycznych właściwości szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* i ich specyficznych struktur obecnie zaliczanych do postbiotyków. Dogłębna analiza tematu skutkuje wysoką liczbą cytowanych pozycji piśmiennictwa (ponad 380) oraz pokazuje dużą dojrzałość Doktorantki w zrozumieniu skomplikowanych zależności pomiędzy bakteriami jelitowymi/probiotykami/postbiotykami/mechanizmami indukującymi procesy alergiczne.

Do tej części pracy mam drobne uwagi:

- na stronie 20 Doktorantka pisze, że „*powiązano alergię pokarmową z występowaniem u dorosłego alergicznego zapalenia nosa*”, ale należy pamiętać, że marsz alergiczny rozpoczynający się najczęściej alergią pokarmową we wczesnym dzieciństwie może skutkować rozwojem nie tylko zapalenia nosa i/lub spojówek, ale również rozwojem astmy. Na tej samej stronie Doktorantka wymienia najczęstsze alergeny pokarmowe, jednak

powinna wyróżnić wszystkie należące do tzw. „wielkiej ósemki” alergenów pokarmowych, tj. mleko krowie, jajo, orzech arachidowy, soja, pszenica, ryby, skorupiaki i orzechy z drzew.

- na stronie 23 w podrozdziale poświęconym leczeniu alergii Doktorantka stwierdza, że „obecnie immunoterapia jest jedynym sposobem leczenia alergii”. Nie do końca mogę zgodzić się z tak kategorycznym stwierdzeniem, gdyż w przypadku alergii pokarmowej jedynym sposobem leczenia jest dieta eliminacyjna. Oczywiście stwierdzenie użyte przez Doktorantkę jest słuszne w przypadku określonych rodzajów alergii i w drugim zdaniu pisze ona, że „w pierwszej kolejności [pacjenci] starają się wyeliminować przyczynę reakcji alergicznej”, ale raczej to stwierdzenie jest użyte w kontekście alergii związanej z kontaktem z alergenem powietrzno pochodnym, domowym itd. (nie pokarmowym).
- nie mogę się również zgodzić ze stwierdzeniem na stronie 25, że to nie rodzaj porodu może mieć wpływ na rozwój alergii w odróżnieniu od innych czynników środowiskowych. Doktorantka na potwierdzenie swoich słów cytuje co prawda opublikowaną w 2022 roku pracę Currell i wsp., jednak jest to praca w jednego ośrodka, która wykazała, że poród cięciem cesarskim nie zwiększa ryzyka rozwoju alergii pokarmowej w kohorcie dzieci w wieku 12 miesięcy. W odróżnieniu od zacytowanej pracy meta-analizy innych prac, w tym meta-analiza badań przeprowadzona w 2020 przez zespół polskich badaczy (Słabuszewska-Józwiak i wsp. Int J Environ Res Public Health. 2020) wykazała, że cięcie cesarskie w porównaniu z porodem droga naturalną wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju astmy (OR = 1.23 95%CI 1.14-1.33, $p < 0.00001$). Podobnie meta-analiza badań przeprowadzona przez Xiong i wsp. w 2022 (Eur J Pediatr 2022 Jun;181(6):2237-2247) wykazała, że cięcie cesarskie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wyprysku atopowego – skórnej postaci alergii pokarmowej u niemowląt (OR = 1.31; 95% CI: 1.04-1.65).
- na stronie 31 – Doktorantka pisze, że szczepy z rodzaju *Bififobacterium* rozkładają fruktooligosacharydy w sianie matka. Czy na pewno chodzi o ten rodzaj oligosacharydów? W sianie i mleku matki obecne są głównie

galaktooligosacharydy, natomiast fruktooligosacharydy obecne są głównie w owocach i warzywach lub są dodawane jako prebiotyki do mieszanek.

Chciałabym jednak podkreślić, że moje uwagi przedstawione powyżej nie wpływają na zawartość merytoryczną wstępu do rozprawy doktorskiej. Ta część pracy wymagała od Doktorantki ogromnej wiedzy interdyscyplinarnej (mikrobiologicznej, immunologicznej i medycznej) i pokazała jej wysoką zdolność analityczną.

Logicznym następstwem przeglądu piśmiennictwa zawartego we wstępie było wyznaczenie przez Doktorantkę celu głównego rozprawy doktorskiej: określenie właściwości immunomodulacyjnych *Bifidobacterium longum* spp. *longum* CCDM 7952 w leczeniu chorób o podłożu alergicznym. Wyznaczony cel główny został przez Doktorantkę osiągnięty poprzez zrealizowanie 3 etapów pracy, które Doktorantka określa jako cele cząstkowe:

- 1) wybranie szczepu z rodzaju *Bifidobacterium* o optymalnych właściwościach przeciw-alergicznym oraz porównanie efektów w modelu *in vitro* żywego szczepu versus szczep inaktywowany termicznie
- 2) porównanie efektów żywego szczepu versus inaktywowany w eksperymentalnym modelu alergii wziewnej indukowanej owalbuminą (OVA)
- 3) określenie właściwości immunomodulacyjnych antygenów powierzchniowych wybranego szczepu.

Materiały użyte do badań oraz metody badawcze Doktorantka opisała w rozdziale 7. Doktorantka szczegółowo opisuje szczepy użyte do badań, metody inaktywacji żywego szczepu, warunki hodowli szczepów i linii komórkowych użytych do analiz *in vitro* oraz metody oceny wpływu inaktywacji na morfologię bakterii (ocena przeprowadzona w skaningowym mikroskopie elektronowym), wielkość, ładunek szczepu. W tej części pracy Doktorantka opisuje dokładnie sposoby oceny właściwości immunomodulacyjnych szczepów bakteryjnych w modelu *in vitro* linii komórkowych (wpływ na produkcję mediatorów reakcji alergicznej, cytokin pro-alergicznym i pro-zapalnych oraz regulujących odpowiedź immunologiczną, ocenę cytotoksyczności, wpływ na produkcję azotynów, ocenę zdolności pochłaniania bifidobakterii przez komórki nabłonka TC-1 i przekazywania bakterii przez

komórki nabłonka i komórki dendrytyczne) oraz komórek dendrytycznych szpiku kostnego i splenocytów izolowanych od myszy Balb/c (naiwnych i uczulonych na OVA).

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka opisuje również bardzo dokładnie model *in-vivo* alergii wziewnej zastosowany w pracy, do którego wykorzystano myszy Balb/c uczulane dootrzewnowym podawaniem OVA, u których faza efektorowa została wywołana donosową ekspozycją na OVA. To badanie zostało przeprowadzone w renomowanym laboratorium gnotobiologicznym w Nowym Hradku w Czechach i uzyskało zgodę Komisji do Spraw Ochrony i Wykorzystania Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk. Badania *in vivo* przeprowadzono na trzech grupach badawczych: jedną stanowiły myszy, którym przed ekspozycją OVA podano donosowo żywe szczepy *B. longum*, drugiej podano szczepy inaktywowane, grupa kontrolna otrzymała rozwór PBS. Po zakończeniu eksperymentu oceniano stężenia cytokin Th1/Th2 w hodowlach splenocytów izolowanych z badanych myszy po restymulacji OVA i w płynie oskrzelowo pęcherzykowym oraz stężenie immunoglobulin IgA i swoistych przeciwciał w klasie IgG1, IgG2, IgA i IgE w surowicy krwi i popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych. U wszystkich zwierząt oceniono też zmiany histopatologiczne w płucach, ze szczególnym uwzględnieniem stopnia zapalenia.

W podrozdziale 7.8 Doktorantka opisała techniki izolacji antygenów powierzchniowych z wybranego szczepu: peptydoglikanu, kwasów lipotejchojowych i polisacharydów. Rozdział „Materiały i Metody” kończy podrozdział dotyczący analiz statystycznych.

Do tej części pracy nie mam większych uwag. Uważam, że zastosowane w pracy metody i materiał zostały bardzo dokładnie opisane, zastosowany model *in vivo* jest dodatkowo zobrazowany ryciną 7. Doktorantka w opisie oceny zmian histopatologicznych zaznaczyła, że zmiany te zostały ocenione przez 2 niezależnych ekspertów. Uważam, że powinna napisać kto i z jakiej instytucji dokonał takiej analizy. Nie znalazłam też informacji dotyczącej użytego modelu *in vivo*? Czy był on wcześniej opisany? Czy został stworzony przez Doktorantkę?

Uzyskane wyniki badań Doktorantka zebrała i przedstawiła w Rozdziale 8. w postaci 19 rycin i 1 tabeli. Opisywane wyniki zostały przedstawione w podrozdziałach zgodnie z zaplanowanymi etapami badań. Przedstawione wyniki etapu pierwszego (wybór szczepu w

modelu *in vitro*) dotyczące wpływu żywych bakterii versus inaktywowanych pozwoliły na wybór szczepu *Bifidobacterium longum* BI 7952 do dalszych badań oraz pokazanie, że żywe bakterie charakteryzowały się innymi efektami immunomodulującymi niż inaktywowane termicznie. Wykorzystując model komórek HEK293 Doktorantka wykazała możliwą rolę wybranych receptorów rozpoznających wzorce bakteryjne (głównie receptor TLR2) w procesie stymulacji procesów immunologicznych. W modelu *in vitro* wykorzystującym komórki śledziony izolowane z myszy uczulonych OVA wykazała, że re-stymulacja alergenem z dodaniem do hodowli wybranych bifidobakterii hamuje pro-alergiczny szlak cytokinowy, ale tylko niektóre z bifidobakterii indukowały wzrost stężenia INF-gamma i IL-6. Wśród ocenianych szczepów *B. longum* wybrany do dalszych badań (IB7952) jednak nie indukował wzrostu IFN-gamma i IL-6, ale znamienne statystycznie obniżał IL-10, która po stymulacji OVA znamienne statystycznie wzrastała (strona 85). Analizując ten wynik zastanawiałam się czy taką odpowiedź można zakwalifikować jako pozytywną? Zwłaszcza w kontekście znaczenia IL-10 jako ewentualnej interleukiny regulującej homeostazę Th1/Th2. Wydaje się, że dołączenie TGB-beta1 do badanego profilu cytokinowego mogłoby przyczynić się do lepszego zrozumienia uzyskanych wyników.

Wybrany szczep *Bifidobacterium longum* był następnie donosowo podawany myszom uczulonym na OVA w postaci żywych (niezmienionych) komórek bakteryjnych lub komórek inaktywowanych termicznie. Ta część wyników w modelu *in vivo* była konsekwencją wcześniej przeprowadzonych analiz. Przeprowadzone badania na modelu *in vivo* wykazały, że żywy szczep *B. longum* podawany donosowo chroni przed rozwojem alergii zarówno na poziomie reakcji lokalnej (płuca) oraz systemowej. Wyniki tej części badań *de facto* potwierdziły to co obserwowano w modelu *in vitro* uczulonych splenocytów: szczep oprócz hamowania produkcji cytokin szlaku Th2 nie indukował aktywacji szlaku Th1, ale też nie aktywował regulującej odpowiedź immunologiczną cytokiny IL-10. Inaktywacja szczepu (donosowe podawanie postbiotyku) skutkowało zmniejszeniem zdolności modulowania odpowiedzi immunologicznej, pokazując wyższą skuteczność żywych szczepów.

Izolacja antygenów powierzchniowych i ich badanie w systemie *in vitro* na komórkach nabłonka płucnego TC-1, komórkach dendrytycznych i splenocytach pokazała ich różne efekty immunomodulujące pobudzane na drodze aktywacji receptora TLR2.

\

Do tej części pracy mam drobne uwagi:

- na stronie 71 Doktorantka pisze, że.... „nie zachodziła jakakolwiek korelacja między zmianami potencjału zeta a wielkością komórki ($p=0.3491$)”.. – jednak w podrozdziale „Analiza statystyczna” nie opisuje jaką metodą oceniała korelację? Jeżeli oceniała korelację, to jaki był współczynnik korelacji?
- na tej samej stronie (71) znajduje się stwierdzenie „bakterie z gatunku *Bifidobacterium*”, ale Doktorantka nie podaje gatunku, więc zasadne byłoby napisanie z rodzaju a nie gatunku.

Rozprawę doktorską kończy dyskusja i wnioski. Uważam, że dyskusja dotycząca uzyskanych wyników powinna być podzielona zgodnie z poszczególnymi etapami pracy (tym bardziej, że jest tak napisana). Na stronie 101 Doktorantka pisze, że„odpowiedni balans między populacjami [makrofagów] umożliwia utrzymanie wewnętrznej homeostazy chroniąc równocześnie przed chorobami autoimmunologicznymi”. Brak jest natomiast informacji czy ma to wpływ na rozwój alergii? Czy znane są Doktorantce prace, w których „balans” między M1 a M2 przyczynia się do zmniejszenia ryzyka alergii? Na stronie 102 Doktorantka pisze, że.... „wysoka produkcja IL-10 w przypadku stymulacji bakteriami wykorzystywanymi w niniejszej pracy może wskazywać.....”, jednak takie stwierdzenie nie jest do końca prawdziwe. Nie wyjaśniono o jakie bakterie chodzi, bo jeśli o wybrany szczep *Bifidobacterium longum* to raczej wykonane badanie wykazywały inną tendencję (co wielokrotnie Doktorantka pokazuje w pracy).

Na stronie 105 Doktorantka pisze, że..... „w obu grupach badawczych zaobserwowano spadek liczby eozynofili”, jednak te wyniki nie zostały pokazane w pracy (jedynie przedstawiono na Rycinie 26 „wyniki histologiczne” - cokolwiek to znaczy). Jeżeli obserwowano taki spadek powinien być on pokazany w rozdziale poświęconym wynikom. Zabrakowało mi też w dyskusji odniesienia do znaczenia drogi podania probiotyku/postbiotyku. Na rycinie 28 (która wg mnie powinna być przedstawiona i omówiona w „Dyskusji”) pokazano efekt podawania żywego szczepu i inaktywowanego, ale raczej dojelitowo, a nie donosowo (nabłonek na rycinie jest jednowarstwowy, a nie wielowarstwowy). Dlatego mam pytanie do Doktorantki – jak na odpowiedź immunologiczną wpływa droga podania probiotyku/postbiotyku?

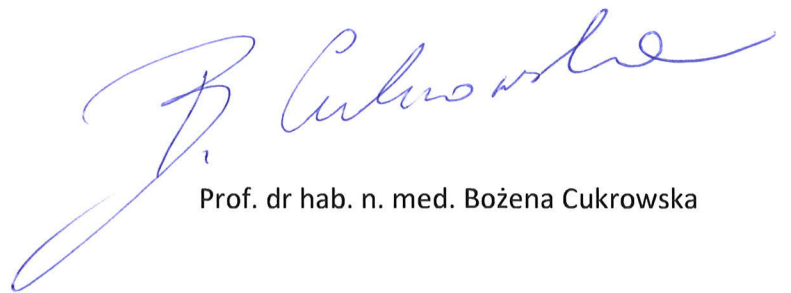
Pracę kończą wnioski, które są logicznym następstwem uzyskanych wyników.

Mnie osobiście bardzo podobał się zarówno sposób opisu oraz prezentacji uzyskanych wyników oraz jasno pokazany „tok myślenia” doprowadzający do końcowych wniosków. Co prawda Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich i językowych. Na przykład Doktorantka używa w pracy terminów „flora” czy „mikroflora” (strona 13, 26-28, 32-41 itd.), co w kontekście ostatnio wprowadzonego nazewnictwa budzi moje zastrzeżenia. Uważam też, że w tytule pracy (a później w publikacjach) powinno podać się całą nazwę gatunku (bez skrótu). Są to jednak drobne uwagi, które nie wpływają na wartość merytoryczną całej rozprawy. Uważam, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki pokazane na różnych poziomach - począwszy od wyboru szczepu w warunkach *in vitro* przez eksperymentalny model alergii do izolacji antygenów odpowiedzialnych za obserwowane efekty jest przykładem wzorcowych badań w zakresie oceny szczepów probiotycznych, ewentualnie postbiotyków i wyboru specyficznego szczepu do badań klinicznych. Moje pytanie więc do Doktorantki jest takie – czy planowane są badania kliniczne z przebadanym szczepem?

Kończąc recenzji chciałabym podkreślić, że opis wyników badań oraz dyskusja wyników przeprowadzona przez Doktorantkę świadczy o dobrej znajomości problemów badawczych, umiejętności logicznego wykorzystania piśmiennictwa oraz krytycznego podejścia do danych literaturowych i własnych. Rozprawa doktorska stanowi kompleksową charakterystykę właściwości immunomodulujących wybranego szczepu *Bififbacterium longum*, który może znaleźć praktyczne zastosowanie w leczeniu/profilaktyce chorób alergicznych .

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. ”Charakterystyka właściwości immunomodulujących B. longum spp. longum CCDM 7952 w leczeniu chorób o podłożu alergicznym” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wnioski o dopuszczenie mgr inż. Marceliny Pyclik do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy. Zgodnie z moją wiedzą uzyskane w pracy wyniki zostały opublikowane w co najmniej 2 oryginalnych artykułach w czasopismach o wysokim IF (Pyclik MJ i wsp. . Front Immunol 2021, IF=7,561; Pytlik i wsp. Int J Biol macromol 2019; IF=4,784) i były realizowane w ramach 2 grantów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki SONATA BIS oraz Narodową Agencję Wymiany Akademickiej MOBILITY, co również potwierdza wysoki poziom badań, które dzięki projektowi MOBILITY mogły być przeprowadzone w jednym z najbardziej renomowanych laboratoriów gnotobiotycznych – w Czeskiej Akademii Nauk w Nowym Hradku.



Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska