



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. Beata Sobieszczńska
Kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Data: 6 październik 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marceliny Joanny Pyclik
z tytułem „Charakterystyka właściwości immunomodulujących *B. longum* spp.
longum CCM 7952 w leczeniu chorób o podłożu alergicznym”
wykonanej w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Zakładu Mikrobiologii
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej
Akademii Nauk pod kierunkiem promotora dr hab. Sabiny Górskiej**

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja jest monografią naukową charakteryzującą właściwości immunomodulujące bakterii probiotycznych z gatunku *Bifidobacterium longum* spp. *longum*.

Probiotyki, których nazwa wywodzi się z łacińskiego „pro bios, „ czyli „dla życia” po raz pierwszy zastosował w leczeniu biegunki u niemowląt doktor Józef Brudziński. Następnie na początku XX wieku Ilja Miecznikow powiązał fakt spożywania jogurtu zawierającego *Lactobacillus acidophilus* z długowiecznością i dobrym zdrowiem chłopów kaukaskich. Dopiero jednak w latach 60-tych probiotyki zaczęto wprowadzać powoli do lecznictwa. Obecnie probiotyki oraz prebiotyki, czyli składniki odżywcze stymulujące wzrost drobnoustrojów probiotycznych, są szeroko stosowane przede wszystkim w zapobieganiu dysbiozy jelit indukowanej antybiotykoterapią. Tym nie mniej, choć stymulujący wpływ probiotyków na układ immunologiczny człowieka jest dość dobrze poznany, zastosowanie drobnoustrojów probiotycznych oraz ich metabolitów nadal jest ograniczone przede wszystkim do badań naukowych. Rosnąca liczba osób z zaburzeniami immunologicznymi i opisane, pojedyncze przypadki poważnych zakażeń ogólnoustrojowych po zastosowaniu probiotycznych szczepów bakterii zdecydowanie ograniczyły ich wykorzystanie w leczeniu chorób. Z drugiej strony, sporadyczne przypadki zakażeń szczepami probiotycznymi zapoczątkowały nowy kierunek badań

izolowanych antygenów bakterii probiotycznych zamiast żywych komórek, w celu eliminacji potencjalnie niekorzystnego wpływu probiotyków na organizm człowieka. Ponadto, w dużym stopniu ograniczone zastosowanie probiotyków w leczeniu wynika z faktu niezajomości wpływu konkretnych, swoistych antygenów tej grupy bakterii na modulację odpowiedzi immunologicznej.

W tym kontekście, przedstawiona mi do recenzji dysertacja Pani mgr inż. Marceliny Pyclik, której celem była ocena właściwości immunomodulujących jednego z najlepiej poznanych szczepów bakterii probiotycznych, tj. *Bifidobacterium longum*, stanowi ważne osiągnięcie naukowe o dużym potencjale aplikacyjnym.

Ocena merytoryczna dysertacji

Opis wykonanych badań został przedstawiony w monografii liczącej łącznie 141 stron o typowym dla tego typu prac naukowych układzie, tj. spisie treści, wykazie stosowanych skrótów, streszczeniach w j. polskim i angielskim, wstępie, celu badań, materiałach i metodach, wynikach, dyskusji, wnioskach i bibliografii.

Streszczenie

Streszczenie zwięzłe, ale logicznie rekapitułuje całość rozprawy doktorskiej oraz nawiązuje do dalszych badań nad przeciwalergicznym działaniem wybranego, scharakteryzowanego szczepu *B. longum*, które Doktorantka kontynuuje w ramach grantu Preludium przyznanego przez NCN.

Wstęp

Podzielony na podrozdziały wstęp prezentuje najważniejsze informacje dotyczące alergii, wpływu mikrobioty człowieka na rozwój i funkcje układu immunologicznego, szczegółową charakterystykę bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz ich antygenów regulujących odpowiedź układu immunologicznego, a będących przedmiotem dysertacji. Niestety, pomimo walorów merytorycznych, rozdział ten trudno się czyta z uwagi na zangielszczoną składnię zdań, a także inne błędy, które wyszczególniłam w uwagach.

Cele i założenia rozprawy doktorskiej

Cel badań Doktorantka realizowała w trzech etapach, obejmujących kolejno: 1) badania profilu cytokin produkowanych *in vitro* przez wybrane komórki immunologiczne oraz komórki nabłonka stymulowane żywymi oraz inaktywowanymi termicznie szczepami *Bifidobacterium*, 2) badania zastosowania zdefiniowanego w pierwszej części badań szczepu *Bifidobacterium* w leczeniu alergii wziewnej na modelu zwierzęcym oraz 3) ocena zdolności immunomodulujących wybranych antygenów powierzchniowych *Bifidobacterium*.

Metody

Do osiągnięcia założonych celów badań Doktorantka wykorzystwała liczne techniki badawcze, wskazujące na Jej duże doświadczenie laboratoryjne, co zasługuje na uznanie.

Wśród zastosowanych technik znalazły się hodowle linii komórkowych pierwotnych i ciągłych, których Doktorantka w badaniach wykorzystwała aż dziewięć, w tym linie modyfikowane, prezentujące ludzkie antygeny, co uwiarygodniło wpływ badanych szczepów *B. longum* oraz ich antygenów na organizm człowieka. Dodatkowo, Pani mgr inż. Marcelina Pyclik pozyskała komórki dendrytyczne szpiku kostnego oraz splenocyty bezpośrednio od zwierząt. Inne metody, które wykorzystwała w swych badaniach to skaningowa mikroskopia niskonapięciowa, spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego, badania histopatologiczne, techniki izolacji i oczyszczania antygenów.

Wyniki

Rezultatem przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz są wartościowe, dobrze udokumentowane wykresami i zdjęciami wyniki badań. Pani mgr inż. Marcelina Pyclik zaobserwowała zmiany strukturalne na powierzchni szczepów *B. longum* poddanych termicznej inaktywacji, które związane były ze zmianą rozmiaru komórek bakteryjnych, potencjału zeta u niektórych badanych szczepów oraz spadkiem przeżywalności w buforze fosforanowym. Pomimo zaobserwowanych różnic Doktorantka nie stwierdziła wpływu termicznej inaktywacji na integralność ścian komórkowej badanych szczepów bakterii. W dalszej części badań Doktorantka zbadała wpływ inaktywowanych termicznie i nietraktowanych wysoką temperaturą szczepów *Bifidobacterium* na makrofagi, które wykazały, że inaktywacja cieplna wpływa na immunomodulującą aktywność badanych szczepów probiotyków. Wyniki te wykazały, że większość inaktywowanych termicznie szczepów *Bifidobacterium* znacznie słabiej pobudzała syntezę antyzapalnej IL-10 przez makrofagi (szlak Treg), w porównaniu do szczepów nietraktowanych, a także w mniejszym stopniu indukowała produkcję cytokin i chemokin prozapalnych na przykład IL-6, MCP-1, TNF α , a także czynnika GM-CSF aktywującego eozynofile i bazofile, pełniące kluczową rolę w reakcji alergicznej. Tym nie mniej, właściwości immunomodulujące, jak zaobserwowała Doktorantka, w dużym stopniu zależały od szczepu *Bifidobacterium*. Wyniki tych badań są niezwykle cenne, gdyż wskazują na konieczność szczegółowych badań aktywności immunomodulacyjnej różnych szczepów bakterii probiotycznych przed ich zastosowaniem w leczeniu. Ponadto, wyniki te wskazują, że inaktywacja termiczna bakterii probiotycznych np. w celu eliminacji ich potencjalnie szkodliwego wpływu na organizm człowieka, związana jest ze znaczącymi zmianami ich aktywności immunomodulacyjnej. Na modelu *in vivo*, tj. mysim modelu alergii wziewnej na owoalbuminę Doktorantka potwierdziła, że termicznie inaktywowany wybrany szczep *Bifidobacterium* posiada słabsze działanie anty-alergiczne niż ten sam szczep nie poddany działaniu temperatury. Wyniki te wskazują, że inaktywacja termiczna atenuuje aktywność anty-alergiczną badanych bakterii probiotycznych, stawiając pod znakiem zapytania ich praktyczne zastosowanie w leczeniu. Jednocześnie, wyniki te dowodzą, że immunomodulująca aktywność probiotyków zależy od współdziałania ich różnych antygenów powierzchniowych wchodzących w interakcje z komórkami immunologicznymi gospodarza. Wyniki te Doktorantka potwierdziła izolując wybrane antygeny powierzchniowe *Bifidobacterium*, takie jak polisacharydy, kwasy lipoteichojoyowe, peptydoglikan, które choć cechowała

zdolność modulowania odpowiedzi immunologicznej, jako izolowane antygeny nie wykazywały oczekiwanej aktywności anty–alergicznej.

Zaprezentowane w dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Marceliny Pyclik wyniki dotyczą bardzo wielu różnych parametrów i w moim odczuciu są zbyt obszerne, co czyni je trudnymi do analizy. Podsumowanie każdego podrozdziału wyników reasumujące najważniejsze zaobserwowane zmiany, np. profilu produkowanych cytokin znacznie ułatwiłoby ocenę tej części pracy. Omówienie wyników Doktorantka sprowadza do krótkich komunikatów bez oceny ich znaczenia, przez co w trakcie czytania traci się obraz całości. Praca sprawia wrażenie przeładowanej wynikami, tracąc spójność. Sądzę, że rozprawa byłaby lepsza, gdyby dotyczyła badań ograniczonych do jednego, wybranego szczepu *Bifidobacterium* lub prezentowała wyniki dla np. wybranych linii komórkowych, zgodnie z zasadą, że czasem mniej znaczy więcej.

Dyskusja

W tej części pracy Doktorantka zestawia i analizuje wyniki swoich badań z danymi dostępnymi w literaturze naukowej. Dyskusja w pełni odzwierciedla niezwykle żywy i niespokojny umysł młodego naukowca jakim jest Pani mgr inż. Marcelina Pyclik. Niestety, podobnie jak wyniki, ta część dysertacji jest przeładowana informacjami. Doktorantka po omówieniu wpływu temperatury na przeżywalność i właściwości fizyko–chemiczne szczepów *Bifidobakterii*, przechodzi do omówienia produkcji tlenu azotu, niepotrzebnie podając w tej części pracy wartości procentowe (to powinno się znaleźć w części omawiania wyników). Następnie omawia cytokiny i chemokiny produkowane przez makrofagi, komórki raka żołądka oraz komórki nabłonka jelit stymulowane szczepami *Bifidobacterium*, a związane z profilem odpowiedzi immunologicznej Th1 i Th2, a dalej pochłanianie bakterii przez komórki eukariotyczne, po czym wraca do omawiania cytokin po stymulacji komórek dendrytycznych. W dalszej części omawia rozpoznawanie *Bifidobacterium* przez receptory TLR2 i ponownie omawia ich profil immunomodulujący dla splenocytów oraz dla modelu *in vivo*.

Zbyt duża ilość informacji czyni dyskusję chaotyczną i sprawiającą wrażenie nieprzemyślanej pod kątem sposobu prezentacji całego materiału. Sądzę, że podział dyskusji na logiczne części byłby pomocny.

Wnioski

Prezentując wnioski z wykonanych badań Doktorantka skupiła na anty–alergicznej aktywności wybranego szczepu *Bifidobacterium*. Wnioski dotyczące immunomodulującego wpływu wybranego szczepu bifidobakterii przedstawione zostały w formie ryciny. Po raz pierwszy spotykam się z taką formą przedstawienia wniosków, jednak muszę przyznać, że biorąc pod uwagę mnogość badanych przez Doktorantkę parametrów immunologicznych, rycina w jasny sposób obrazuje różnice immunomodulacyjne pomiędzy termicznie inaktywowanym i nieinaktywowanym szczepem *Bifidobacterium* BI 7952. Jednak, pomimo licznych badań sekrecji cytokin dla wybranych szczepów *Bifidobacterium*, przez różne linie komórkowe, wyniki tych badań zostały zupełnie pominięte we wnioskach.

Piśmiennictwo

Niestety brak numeracji cytowanych pozycji piśmiennictwa, które zajmuje 21 i pół strony, więc jest niezwykle obszerne. Co więcej, znakomita większość cytowanych pozycji pochodzi z ostatnich dziesięciu lat i obejmuje aktualną wiedzę na temat badawczy Doktorantki. Ilość cytowanej literatury wskazuje także na niezwykle zaangażowanie naukowe Pani mgr inż. Marceliny Pyclik w badanym temacie i czyni ją specjalistką w tym obszarze wiedzy, co zasługuje na podkreślenie i uznanie.

Dorobek naukowy mgr Marceliny Pyclik

Pani mgr inż. Marcelina Pyclik jest autorem 8 pełnotekstowych publikacji w czasopismach naukowych o światowym zasięgu, w tym pierwszym autorem w czterech z nich, uzyskując przed doktoratem wysoki impact factor o wartości 42,567. Doktorantka jest także współautorem trzech patentów, które dotyczą tematów badawczych innych niż drobnoustroje probiotyczne, co wskazuje na Jej rozległe zainteresowania naukowe. Uczestniczyła również w 12 konferencjach naukowych oraz brała udział w 6 projektach badawczych, z których jeden tj. grat Preludium z NCN kontynuuje jako kierownik obecnie. Dodatkowo, Pani mgr inż. Marcelina Pyclik odbyła pięć zagranicznych staży naukowych oraz jest stypendystką programu Bio-Lab pod patronatem Fundacji Fulbright, stypendystką Amerykańskiego Towarzystwa Immunologów oraz Dyrektora dla najlepszych doktorantów. Wyróżniona została przez Prezydenta Miasta Wrocławia w studenckim programie stypendialnym.

Znaczący dorobek Pani mgr inż. Marceliny Pyclik wskazuje, że jest Ona osobą niezwykle aktywną naukowo.

Uwagi

- 1) Tytuł pracy powinien zawierać pełną nazwę gatunku badanego drobnoustroju.
- 2) Skrót używany w pracy powinny być rozwinięte przy ich pierwszym zastosowaniu, np. OVA (Rozdział Wstęp, str. 19).
- 3) Liczne literówki, błędy interpunkcyjne, a nawet ortograficzne (Rozdział Wstęp, str. 19, „zdaża się”), brak roku cytowanej pracy (Rozdział Wstęp, str. 27, „Badania Stefka i wsp.), nieprawidłowe skróty (np. współp. – powszechnie stosowany jest skrót wsp.)
- 4) Nieprawidłowe zastosowanie nazw – minerał to pierwiastek lub związek chemiczny w stanie krystalicznym, naturalnie ukształtowany – dla organizmu niezbędne są składniki mineralne (Rozdział Wstęp, str. 26);
- 5) Nieprawidłowe sformułowania: „wyższy poziom właściwości proteolitycznych w komórkach tucznych” (Rozdział Wstęp, str. 27) – sądzę, że powinno być aktywności enzymów proteolitycznych w komórkach tucznych.
- 6) Nazwa mikrobiom, którą Doktorantka nieprawidłowo stosuje opisując rolę mikrobioty we wstępie, określa zbiór genomów drobnoustrojów; Mikrobiota to zbiór mikroorganizmów.
- 7) Niepotrzebne i niestosowane spolszczenie skrótu PBS (Rozdział Wyniki, PBSu, PBSie).

- 8) Niepoprawna odmiana czasowników w zdaniach w całej pracy (np. ..."umożliwia bakterii manipulować ładunkiem na powierzchni komórki..." lub ..."badane antygeny wykazują się...")
- 9) Niespodziewana numeracja wierszy na stronie 90.

Moje powyższe uwagi wynikają przede wszystkim z obowiązku recenzenta, nie mają natomiast na celu umniejszenia jakości dysertacji, a szczególnie jej wysokiej wartości merytorycznej.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marceliny Pyclik na temat „*Charakterystyka właściwości immunomodulujących B. longum spp. longum CCM 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.) i zawiera obszerny materiał o dużej wartości naukowej. Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy a tematyka przedłożonej mi do oceny Jej dysertacji doktorskiej stanowi istotny wkład w rozwój nauki. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Marceliny Pyclik do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
kierownik
prof. dr hab. Beata Sobieszkańska