

Warszawa, 10.01.2022r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

*p.t. „Wpływ *Lactobacillus rhamnosus* GG 53103
na modulację regulacyjnych mechanizmów immunologicznych
oraz odpowiedź śródbłonna naczyniowego w patogenezie miażdżycy”*

wykonanej w Klinice Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
przez mgr Katarzynę Wojdan
Promotor pracy: prof. dr hab. Marlena Broncel

Zmiany w mikroflorze jelitowej wpływają na progresję chorób układu krążenia oraz chorób kardiometabolicznych. Mimo, iż wpływ metabolizmu mikroflory jelitowej został już dobrze zbadany, to jednak związek tych mikroorganizmów z ryzykiem sercowo-naczyniowym jest nadal dyskusyjny. Odpowiednia suplementacja probiotykami jest w stanie zakłócać zarówno funkcję, jak i skład mikroflory jelitowej, skutkując aktywacją układu odpornościowego i kontrolą stanu zapalnego. Złożona ekologia mikroflory jelitowej i jej wpływ na funkcjonalność metaboliczną jest przedmiotem zainteresowania zarówno klinicystów, jak i badaczy układu sercowo-naczyniowego. Przydatność szczególnie probiotyków w zmianie mikroflory jelitowej stała się nowym realnym celem w ewentualnym zapobieganiu i leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy i składa się z: przejrzystego spisu treści, rycin (w tym zdjęć), wykazu skrótów, zwięzłego wstępu, założeń i hipotez badawczych, z uwzględnieniem szczegółowego celu pracy, z opisem materiału klinicznego oraz metod badawczych, przedstawieniem wyników, z ciekawą dyskusją wraz z wnioskami końcowymi. Końcowymi punktami dysertacji są streszczenia w języku polskim, angielskim oraz bogate piśmiennictwo.

W świetle dostępnej, niepełnej wciąż wiedzy, temat podjęty przez Doktorantkę należy uznać za niezwykle interesujący, ważny i bardzo aktualny. Pani mgr Katarzyna Wojdan w swej rozprawie doktorskiej stara się poznać podstawowe mechanizmy molekularne odpowiadające za działanie probiotycznej bakterii *Lactobacillus rhamnosus* GG 53103 na funkcję komórek nabłonka (Caco2) oraz komórek śródbłonna naczyniowego

(HUVEC) stymulowanych 7-ketocholesterolem. Jednocześnie w swych badaniach Doktorantka uwzględniła rolę i wpływ bakterii probiotycznych w indukcji komórek dendrytycznych w kierunku odpowiedzi przeciwzapalnej.

Do realizacji powyższych planów badawczych Autorka stworzyła dwa modele doświadczane *in vitro*: 1) model hodowli mieszanej nabłonka jelitowego i komórek dendrytycznych w obecności bakterii *Lactobacillus rhamnosus* oraz 2) hodowli komórek śródbłonka naczyniowego indukowanej nadsącami z hodowli mieszanej. Obecność bakterii probiotycznej jedynie w pierwszym z tych modeli jest wysoce uzasadniony, albowiem bakterie te, w przeciwieństwie do bakterii patogennych, nie wnikają do krążenia. Ten fakt leżał także u podstaw, iż w drugim modelu komórek śródbłonka naczyniowego zastosowano nadsące zawierające metabolity bakterii *Lactobacillus rhamnosus*. W obu modelach czynnikiem indukującym stan zapalny był 7-ketocholesterol (7-KCh). Wybór ten jest uzasadniony, bowiem 7-ketocholesterol, jest najobficiej występującym oksysterolem obecnym w oksydacyjnie zmodyfikowanych LDL (OxLDL). OxLDL nie jest jedynym źródłem 7-ketocholesterolu w organizmie. Może on być wytwarzany endogennie przez szereg etapów utleniania lub reakcje enzymatyczne. Może być także dostarczany z pożywieniem, co daje możliwość kontaktu z nabłonkiem jelitowym; jest bowiem metabolizowany (inaktywowany) dopiero w wątrobie.

Obydwa modele doświadczalne zostały przez Autorkę dogłębnie kontrolowane. Kontrole te obejmowały wszystkie podstawowe elementy, a więc: potwierdzenie prawidłowości separacji monocytów oraz wyprowadzania komórek dendrytycznych metodą cytometrii przepływowej a także opracowanie optymalnej dawki CFU *Lactobacillus rhamnosus*. Opis i zamieszczone schematy modeli doświadczalnych są wystarczająco szczegółowe z jednym, ale ważnym wyjątkiem. W całej rozprawie nie podano stężenia 7-ketocholesterolu stosowanego w doświadczeniach. Dobór odpowiedniego stężenia 7-KCh jest niezwykle istotny w świetle jego silnego działania cytotoksycznego. Autorka powinna zbadać zależną od stężenia 7-KCh cytotoksyczność i stosować takie jego stężenie, które wykazuje jego właściwości prozapalne.

W niektórych badaniach, dostępnych w literaturze, stosowano 15 μ M stężenie 7-KCh jako stężenie nie wpływające na przeżywalność komórek ARPE-19 (*Larrayoz et al. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 4942–4955; DOI:10.1167/iops.09-4854). W badaniach tych wykazano indukcję przez 7-KCh transkrypcji genów *VEGF*, *IL-6* i *IL-8*. Mój niepokój budzi fakt, iż Autorka nie zaobserwowała żadnego efektu 7-KCh na ekspresję genu *IL-10* i okludyny w komórkach dendrytycznych ani *IL-33*, *ICAM*, *PECAM* oraz okludyny w komórkach śródbłonka naczyniowego. Fakty te mogą być spowodowane zbyt niskim stężeniem 7-KCh lub wręcz odwrotnie zbyt wysokim, wręcz cytotoksycznym. Mam jednak nadzieję, że przedstawione przeze mnie wątpliwości zostaną w pełni wyjaśnione przez Doktorantkę podczas obrony pracy doktorskiej.

Niezaprzeczalnym, nowatorskim osiągnięciem Doktorantki jest zastosowanie po raz pierwszy unikalnego modelu, w którym badała działanie nadsączy z hodowli mieszanej po indukcji *Lactobacillus rhamnosus* na właściwości i funkcję komórek śródbłonka naczyniowego.

W badaniach tych wykazała, że produkty metabolizmu *Lactobacillus rhamnosus* zawarte w nadsączach powodują spadek ekspresji mRNA okludyny i IL-33, wzrost transkrypcji genu *ICAM*, podczas gdy bez zmian pozostawała ekspresja genu *PECAM*. Na obserwowane efekty nie miała wpływu obecność w układzie doświadczalnym 7-KCh, co zresztą nie jest zaskakujące w świetle wcześniejszych wyników. Ponadto, jak słusznie zauważa Autorka, *Lactobacillus rhamnosus* ma dwa oblicza, z jednej strony jest w stanie hamować stymulację cytokin prozapalnych przez bakterie patogenne, podczas gdy z drugiej strony sam może powodować ich wzrost. Istotnym z punktu widzenia patogenezy miażdżycy jest stwierdzenie, iż metabolity *Lactobacillus rhamnosus* przyczyniają się do spadku integralności monowarstwy komórek śródbłonka skorelowanej ze zmniejszeniem ekspresji okludyny przy jednoczesnym wzroście ekspresji na powierzchni komórek, adhezyjnej cząsteczki przylegania międzykomórkowego (*ICAM*). W tych warunkach może dochodzić do ułatwionej adhezji i migracji monocytów do wnętrza ściany naczyniowej i zainicjowania powstawania zmiany miażdżycowej.

Uwagi redakcyjne:

1. *Wstęp* obejmuje zagadnienia związane z patogenezą miażdżycy, w tym przede wszystkim przemiany cholesterolu oraz udział śródbłonka naczyniowego i komórek dendrytycznych. Autorka wykazała się doskonałą znajomością literatury w tym zakresie oraz umiejętnością jej krytycznego przedstawienia. Jedynym mankamentem jest brak odpowiednich rycin i schematów obrazujących przedstawiane procesy.
2. *Założenia i cel pracy* przedstawione jasno i precyzyjnie w postaci logicznej sekwencji doświadczeń.
3. *Materiały i metody* opisane bardzo szczegółowo, co znacznie zwiększa zaufanie do prezentowanych wyników.
4. *Wyniki* są zaprezentowane tylko w postaci rycin, bez jakiegokolwiek komentarza. Utrudnia to znacznie rozumienie następstwa prezentowanych wyników. Brak też chociaż oddzielnego rozdziału pt. *Omówienie wyników*. Jednocześnie Autorka nie ustrzegła się drobnego niedociągnięcia na Rycinie 11 (str. 43), w której na osi czasu są liczby, ale bez podania ich wymiaru (czy są to minuty, godziny, doby?). Ponadto, w opisie rycin brak jest informacji co oznaczają tzw. „wąsy” - błąd standardowy (SD) lub średni błąd średniej (SEM) i z ilu oddzielnych doświadczeń zostały wyliczone. Jest to niezwykle ważne, bowiem w rozdziale metody Autorka nie zamieściła punktu Analiza statystyczna.
5. *Dyskusja* jest podzielona na trzy części: 1) rola mikrobiomu a przede wszystkim bakterii probiotycznych w homeostazie organizmu, 2) wyniki uzyskane w pierwszym modelu doświadczalnym (hodowle mieszane komórek nabłonka jelitowego i komórek dendrytycznych) oraz 3) wyniki badań osiągnięte w hodowlach komórek śródbłonka naczyniowego. Taki podział dyskusji wydaje się być uzasadniony ze względu na różne modele komórkowe, ale i także różne znaczenie patofizjologiczne obserwowanych efektów. Dyskusja przeprowadzona jest w oparciu o bogatą literaturę, co świadczy o znakomitym

teoretycznym przygotowaniu Autorki a także o umiejętności krytycznej oceny własnych wyników i danych z piśmiennictwa.

6. *Wnioski* zostały przedstawione w postaci sześciu punktów, które w większości stanowią podsumowanie podstawowych wyników. Wydaje się, że niektóre z nich raczej nie wypływają bezpośrednio z przeprowadzonych badań. Takim przykładem są stwierdzenia: „...Bakterie probiotyczne *Lactobacillus rhamnosus* GG, obecne w przewodzie pokarmowym niezależnie od 7-ketocholesterolu, za pośrednictwem komórek dendrytycznych zmniejszają integralność śródbłonna naczyniowego i ekspresję mRNA okludyny w komórkach śródbłonna (pkt. 3) a także wpływają na funkcję immunomodulacyjną śródbłonna naczyniowego, zmniejszają ekspresję mRNA IL-33 w komórkach śródbłonna oraz powodują wzrost ekspresji mRNA ICAM-1 na ich powierzchni (pkt. 4)”. Te bardzo ważne efekty nie zostały jednak stwierdzone pod wpływem bakterii obecnych w przewodzie pokarmowym, ale w doświadczeniach *in vitro* z zastosowaniem produktów ich metabolizmu, powstających w następstwie interakcji z komórkami nabłonka jelitowego i komórkami dendrytycznymi w zastosowanym modelu hodowli mieszanej. Autorka nie zdecydowała się na jakąkolwiek konkluzję uogólniającą wyniki przeprowadzonych badań. Świadczy to z jednej strony o krytycyzmie Doktorantki a z drugiej o świadomości, że niektóre z nich wymagają dalszych, pogłębionych badań. Mam nadzieję, że podczas obrony pokusi się jednak na przedstawienie takiej konkluzji, chociaż w trybie przypuszczającym.

7. *Piśmiennictwo* zostało bardzo dobrze wyselekcjonowane i w większości pochodzi z ostatniej dekady.

Reasumując uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Wojdan zawiera znaczące elementy nowości naukowej i w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora. Przedstawione wyniki wnoszą znaczący wkład w zrozumienie zależności pomiędzy mikroflorą jelitową, w szczególności bakteriami probiotycznymi, a funkcją zarówno nabłonka jelitowego, jak i komórek śródbłonna naczyniowego. Pragnę również podkreślić, że sformułowane przeze mnie uwagi i spostrzeżenia miały jedynie sprowokować Autorkę do dyskusji, nie podważając wysokiej merytorycznej wartości, przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

Mam zaszczyt i ogromną przyjemność przedstawić Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Wojdan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Grażyna Sygnowicz