

Prof. dr hab. n. med. Leokadia Bąk-Romaniszyn  
Zakład Żywienia w Chorobach Przewodu Pokarmowego  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi  
ul. Rzgowska 281/289  
Tel. 42 2711388, 604938441  
e-mail; leokadia.bak-romaniszyn@umed.lodz.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Anny Marii Gładkiej  
p.t. „Obecność bakterii *Helicobacter pylori* w ślinie u dzieci szkolnych”.**

Zakażenia bakteryjne i wirusowe występują u ludzi od stuleci. Częstość ich występowania, intensywność i przebieg kliniczny zakażenia są zróżnicowane. Mogą występować sporadycznie, endemicznie oraz, co mieliśmy okazję przekonać się w ostatnich latach, ich występowanie i zachorowalność są tak częste, że określane jest mianem epidemii a nawet pandemii. Zidentyfikowanie czynnika chorobotwórczego bywa niezwykle trudne i żmudne. Pierwsze obserwacje materiału badanego czynione były z pomocą szkiełka a potem mikroskopu.

Pierwsze doniesienia o obecności bakterii w żołądku ukazały się w piśmiennictwie około 100 lat temu. Spiralne organizmy obserwowano i opisywano w żołądkach psów, kotów, świńek i małp już w latach dziewięćdziesiątych XIX wieku. W 1899 polski badacz Walery Jaworski w swym polskojęzycznym podręczniku chorób żołądka opisał obecność bakterii, które nazwał *Vibrio rugula*, a które zidentyfikował w popłuczynach żołądkowych i opisał ich prawdopodobny związek z zapaleniem żołądka.

Kolejne doniesienia publikowane były przez „zachodnich” badaczy w języku angielskim. W 1906 roku niemiecki uczyony Krienitz stwierdził obecność „krętków” w żołądku pacjenta z owrzodzeniem rakowym. W 1913 roku Rosenow w USA opisał obecność paciorkowców w 96% hodowli pochodzących z żołądków resekowanych z powodu choroby wrzodowej. W 1921 roku Luger i Neuberger potwierdzili odkrycie Krienitza sprzed 15 lat znajdując spiralne formy bakterii błonie śluzowej żołądka i soku żołądkowym pacjentów z rakiem żołądka, a także zdrowych osobników. Niestety, w 1954 roku Palmer na podstawie analizy wycinków błony śluzowej z ponad 1100 biopsji stwierdził, iż spiralne formy widoczne na powierzchni śluzówki są następstwem zanieczyszczeń a nie czynnikiem chorobotwórczym, co spowodowało zmniejszenie zainteresowania tymi bakteriami i zaprzestanie badań.

W 1975 roku Steer i Colin-Jones stwierdzili obecność spiralnych bakterii oraz naciek z wielojądrzastych leukocytów w błonie śluzowej żołądka u 80% pacjentów z wrzodem oraz brak opisywanych zmian w żołądkach osób zdrowych. Obserwowaną bakterię z rzęskami na jednym

z końców uczeni ci zidentyfikowali jako Gram ujemną pałeczkę ropy błękitnej. Ich argumenty o patogennej roli tej bakterii dla zapalenia błony śluzowej żołądka nie znalazły uznania w opinii innych badaczy a sugestia o znaczeniu zakażenia bakteryjnego w wywoływaniu choroby wrzodowej została zapomniana.

Dopiero australijscy lekarze Robin Warren (patolog) i Barry Marshall (internista) w swoich badaniach ponownie wrócili do badań dotyczących obecności spiralnych form bakteryjnych w żołądku. Stwierdzili oni obecność małych, zakrzywionych, S-podobnych bakterii u ponad 100 pacjentów. Obserwowane bakterie wykazywały duże „powinowactwo” do powierzchni zmienionej zapalnie błony śluzowej z naciekiem z komórek wielojądrzastych a z hodowli bioptatu w 5 dniowej inkubacji znaleziono płytkę obficie przerośniętą bakteriami podobnymi do obserwowanych poprzednio w śluzówce. Wyhodowaną kulturę bakteryjną nazwano *Campylobacter like organism*, a następnie *Campylobacter pyloridis*. W doświadczeniach na własnych osobach wykazali związek zakażenia *Campylobacter pyloridis* (później nazwanej *Helicobacter pylori*) z zapaleniem błony śluzowej żołądka, zastosowali efektywne leczenie eradykacyjne czyli postulaty Kocha (wyizolowali, zakazili, wyleczyli) o udziale tej bakterii w patogenezie zapalenia błony śluzowej żołądka zostały spełnione. Swoje odkrycie Marshall i Warren ogłosili w 1983 roku. Spowodowało to pojawienie się licznych doniesień o podobnych obserwacjach. Od tej pory odnotowuje się rozwój badań nad rolą tych bakterii w etiopatogenezie przewlekłego zapalenia błony śluzowej.

W 1994 r. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) została uznana przez Światową Organizację Zdrowia za czynnik karcinogeny klasy I.

Rozpowszechnienie *H.pylori* jest duże, dotyczy zarówno dzieci, jak i osób dorosłych. Częściej występuje u dorosłych i w krajach o niskim statusie socjoekonomicznym. Zakażenie *H.pylori* nabywane jest najczęściej w dzieciństwie drogą oralną. *H.pylori* charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem genetycznym, podatnością na mutacje oraz zdolnością do kształtowania własnych mechanizmów unikania sił obronnych w organizmie zakażonym. Genom jest kluczem do funkcji biologicznych. *H.pylori* produkuje; katalazę, oksydazę, ureazę, fosfatazę alkaliczną, gamma-glutamylotranspeptydazę, aminopeptydazę leucyny, fosfolipazę A2, lipazę, proteazę, DNA-zę, dysmutazę ponadtlenkową, cytotoksynę wakuolizującą kodowaną przez gen *vacA* oraz cytotoksynę kodowaną przez gen *cagA*.

Ze wszystkich w/w enzymów najsilniejsze działanie antygenowe w stosunku do komórek błony śluzowej wykazują kodowane przez gen *cagA* białka zewnątrzkomórkowe (cytotoksyna CagA) i kodowane przez gen *vacA* białka (cytotoksyna VacA).

Zasiedlanie błony śluzowej żołądka przez *H.pylori* dotyczy zwłaszcza okolicy przedodźwiernikowej, a niekiedy też ognisk metaplazji nabłonka żołądkowego w przełyku

i dwunastnicy. Po adhezji *H.pylori* do nabłonka żołądkowego rozpoczyna się proces uszkodzenia komórek nabłonka błony śluzowej, który warunkuje dalszy przebieg zmian morfologicznych i czynnościowych żołądka. Zakażenie *H.pylori* inicjuje odpowiedź ustroju o charakterze miejscowego procesu zapalnego, początkowo ostrego, a następnie przewlekłego. W wyniku powyższych interakcji, a zwłaszcza w następstwie miejscowych zaburzeń czynnościowych, morfologicznych oraz immunologicznych błony śluzowej żołądka, może wystąpić nisza wrzodowa, zaostrenie oraz inne powikłania, bądź okres bezobjawowego wyciszenia zapalenia, które może trwać wiele lat. Ewolucja zmian w błonie śluzowej od zakażenia człowieka *H.pylori* do rozwoju wrzodu trwa kilka, a nawet dziesiątki lat. Powikłania przewlekłego zakażenia *H.pylori*, pod postacią raka czy chłoniaka żołądka, dotyczą zwykle populacji ludzi dorosłych.

Rozpoznanie zakażenia opiera się głównie o metody inwazyjne; gastrofiberoskopie z oceną wycinków w tesie ureazowym, badaniu histologicznym, hodowlą i oceną lekowrażliwości. Badania nieinwazyjne, jak ureazowy test oddechowy, badanie antygenu bakterii w kale – stosowane są głównie do oceny efektów terapii.

Podjęmowano już próby oznaczania przeciwciał anti-*H.pylori* klasy IgG w ślinie jako przydatną nieinwazyjną przesiewową metodą wykrywania zakażenia *H.pylori* w badaniach epidemiologicznych.

W ostatnich latach nowe wytyczne mikrobiologiczne w diagnostyce zakażeń bakteryjnych wskazują na badanie metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) jako wiodące w postawieniu rozpoznania. PCR technika biologii molekularnej pozwala przy zastosowaniu reakcji enzymatycznej polimeryzacji na wykrywanie i wyizolowywanie nawet śladowych ilości DNA bakteryjnego. Metodą amplifikacji i ich zwielokrotnienia przez hybrydyzację przeprowadza się porównanie sekwencji nukleotydów w odniesieniu do wzorca matrycowego DNA bakterii i identyfikowanie genomu drobnoustroju.

Metoda ta ma również zastosowanie (aczkolwiek bardzo mało wykorzystywane) w diagnostyce *H.pylori* w błonie śluzowej żołądka. Jej dodatkową zaletą jest fakt iż pozwala również na stwierdzenie zmian w układzie fragmentów restrykcyjnych sekwencji DNA, czyli wykrycie mutacji bakteryjnych oraz niewykrywalnych metodami mikrobiologicznymi, form kokoidalnych *H.pylori*.

Zakażenie *H.pylori* występuje na całym Świecie. Przewlekły charakter zakażenia *H.pylori* oraz odległe następstwa długotrwałego zakażenia u ludzi, pod postacią rozrostu nowotworowego w żołądku, wskazują na potrzebę prowadzenia kompleksowych badań nad przebiegiem zakażenia *H.pylori*, zwłaszcza u dzieci i opracowania nieinwazyjnych metod diagnostycznych pozwalających na szybką diagnostykę, interwencję terapeutyczną oraz monitorowanie przebiegu

procesu zakażenia. Metody nieinwazyjne mogą też mieć istotne znaczenie diagnostyczne dla celów epidemiologicznych.

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorantka podjęła się oceny występowania materiału genetycznego bakterii *H.pylori*, a dokładnie alleli *s1* i *s2* genu *vacA* *H.pylori* w ślinie i wycinkach błony śluzowej żołądka dzieci z rozpoznanym zakażeniem *H.pylori*.

Doktorantka założyła ustalenie obecności bakterii *H.pylori* na podstawie występowania genotypu bakterii w ślinie i błonie śluzowej żołądka równocześnie oraz korelacji między genotypem bakterii a objawami klinicznymi, występowaniem bakterii w ślinie a obecnością próchnicy zębów.

Badaniom zostały poddane dzieci z objawami klinicznymi.

Grupę badawczą stanowiło 44 dzieci w wieku 6 lat do 17 lat i 6 m-cy (śr. 13,6 +/- 3,67 lat) z potwierdzonym zakażeniem *H.pylori*. Grupę kontrolną stanowiło 72 dzieci w wieku 4 lat i 6 m-cy do 17 lat i 10 m-cy (śr.13,2 +/- 3,25 lat) z wykluczonym zakażeniem *H.pylori*.

Zakażenie *H.pylori* diagnozowano na podstawie testu ureazowego i badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej żołądka pobranych w czasie gastrofiberoskopii. Za dodatni wynik przyjmowano dodatni test ureazowy oraz obecność spiralnych form w wycinkach błony śluzowej żołądka.

Materiałem badawczym w przedstawionej dysertacji była ślina dzieci i biopaty błony śluzowej żołądka. Analiza opierała się na amplifikacji fragmentu genu kodującego cytotoksynę wakuolizującą *H.pylori* w reakcji łańcuchowej polimerazy. Za wynik pozytywny testu na obecność wariantu *vacA/s1* uznawano stwierdzenie produktu reakcji PCR o wielkości 120 pz, a wariantu *vacA/s2* - 150 pz.

Ponadto przeprowadzono ocenę stomatologiczną uzębienia i badanie kwestionariuszowe.

Przedłożona do oceny dysertacja liczy 90 stron tekstu ilustrowanego 2 rycinami, 12 tabelami. Praca ma typowy układ; wstęp i dane z piśmiennictwa, założenia i cel pracy, materiały i metody badawcze, wyniki i omówienie wyników badań, dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, aneks. Zamieszczony jest również wykaz skrótów zastosowanych w pracy.

Interesujący wstęp zawarty na 31 stronach stanowi omówienie wirulencji bakterii *Helicobacter pylori* zależnej od jej genomu i jej związku z zapaleniem błony śluzowej żołądka, oraz chorobą wrzodową dwunastnicy. Jest również przeglądem aktualnej wiedzy o *H.pylori*, epidemiologii, drogach transmisji i metodach diagnostyki zakażenia. Szczególnie dużo uwagi poświęciła Doktorantka streszczeniu dotychczasowej wiedzy na temat występowania *H.pylori* w jamie ustnej, płycie nazębnej, ślinie.

Całościowo Wstęp – został przedstawiony została w sposób jasny i klarowny, świadczący o dobrej znajomości poruszanych przez Doktorantkę zagadnień.

Założenia i cel pracy przedstawione zostały precyzyjnie.

W rozdziale materiały i metody badawcze Doktorantka dokonała charakterystyki grupy badanej z podziałem na analizowane podgrupy, szczegółowego opisu stosowanych metod badawczych oraz analiz statystycznych. Wartość merytoryczna wykonanych badań nie budzi zastrzeżeń, podobnie jak zastosowane metody obliczeń statystycznych.

Badania realizowała w grupie 116 dzieci w wieku od 4 lat 6 m-cy do 17 lat 10 m-cy (śr. 13,6 +/- 3,4).

Wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane i omówione szczegółowo. W badaniach Doktorantka wykazała;

- zakażenie *H.pylori* równie często występowało u dziewcząt, jak i chłopców, mieszkańców miast i wsi; w grupie bez zakażenia przeważały dziewczynki z miasta, .
- liczba dzieci w rodzinie, zakażenie *H.pylori* u Rodziców nie stanowiły ryzyka transmisji zakażenia ,
- objawy kliniczne, jak; utrata łaknienia, spadek masy ciała, czy pokrzywka równie często występowały u dzieci z i bez zakażenia *H.pylori*, natomiast bóle brzucha istotnie częściej u dzieci badanych bez zakażenia *H.pylori*(-),
- odżywienie w obu grupach było porównywalne,
- w ślinie stwierdzono obecność genów toksyny wakuolizującej *vacA H.pylori* u 81.6%, w tym alleli *s1* u 71,1% badanych dzieci z potwierdzonym standardowymi metodami zakażeniem *H.pylori*, *s2* u 42,1%, *s1s2* 31.6%, występowanie alleli *s1* było istotnie częstsze niż alleli *s2 vacA H.pylori* ( $p=0,011$ ),
- w żołądku wykryto obecność genów *vacA H.pylori* u 65,9 % dzieci *H.pylori* (+), również występowanie alleli *s1* było istotnie częstsze ( $p= 0,002$ ) niż alleli *s2 vacA H.pylori* (odpowiednio 61% i 26,8%), *s1s2* -22%,
- nie stwierdzono zależności statystycznej między obecnością genu *vacA* w błonie śluzowej żołądka a występowaniem objawów klinicznych u dzieci,
- nie stwierdzono zależności między obecnością genu cytotoksyny wakuolizującej *vacA s1* i *vaA s2* w ślinie dzieci zakażonych a wartością wskaźnika PUW (próchnica- usunięte-wypełnione) u dzieci,
- nie stwierdzono zależności między obecnością genu *vacA s1* i *vacA s2* w błonie śluzowej żołądka a wartością wskaźnika PUW u dzieci,

Dyskusja, w której Doktorantka umiejętnie konfrontuje wyniki własne z doniesieniami z piśmiennictwa liczy 18 stron.

Tekst jest napisany poprawnym językiem, opracowanie pracy i graficzne wyników bardzo staranne.

Pracę kończą 4 wnioski będące w większości podsumowaniem wyników. Wnioski dowodzą słuszności hipotezy stawianej przed podjęciem badań.

Autorka wykorzystwała 156 pozycji piśmiennictwa właściwie dobranych pod względem tematycznym co świadczy, że była dobrze przygotowana teoretycznie do realizacji postawionego zadania badawczego. Piśmiennictwo napisane jest w kolejności cytowania, z dobrze przestrzeganą konsekwencją interpunkcyjną i bibliograficzną. Przeważają prace z obecnego stulecia, anglojęzyczne. Uwaga; Przy cytowaniu pozycji książkowych nie odniosła się do rozdziałów i ich autorów.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że w przedstawionej mi do recenzji pracy kierunek zaprogramowanych badań odpowiada w pełni potrzebom pogłębiania i aktualizacji wiedzy na temat nieinwazyjnych metod diagnozowania zakażenia *Helicobacter pylori*, wykorzystania do tego bardzo dostępnego materiału biologicznego jakim jest ślina, z zastosowaniem mikrometody, i wykorzystania bardzo czułej techniki jaką jest badanie metodą PCR. Jedynym ograniczeniem wydaje się być dostępność badań polimerazowej reakcji łańcuchowej, która dla miast akademickich nie jest problemem, a postęp diagnostyczny i technologiczny powoduje, że stają się coraz częściej stosowane.

Zaplanowany przez Doktorantkę program badawczy został konsekwentnie zrealizowany.

Reasumując stwierdzam, że powierzona mi do oceny rozprawa pt. „Obecność bakterii *Helicobacter pylori* w ślinie u dzieci szkolnych” jest oryginalnym dorobkiem naukowym Doktorantki i spełnia warunki stawiane pracom doktorskim.

Mam zaszczyt przedstawić Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lekarza medycyny Annę Marię Gładką do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o nagrodzenie pracy.

Łódź, 5 sierpnia 2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Leokadia Bąk-Romaniszyn

8193471  
Prof. dr hab. n. med.  
LEOKADIA BĄK-ROMANISZYN  
specjalista chorób dzieci  
gastroenterolog  
Łódź, ul. Trwała 3  
*Leokadia Bąk-Romaniszyn*