

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 Mateusza Zakrzewskiego
p.t. „Wybrane markery stanu zapalnego w ślinie dzieci zakażonych *Helicobacter
pylori*”.**

Odkrycie bakterii *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) i uznanie jej roli w etiopatogenezie zapalenia błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej, raka czy chłoniaka żołądka w istotny sposób zmieniło postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne w tych chorobach. W 1994 r. *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. 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. Przyjmuje się, że zróżnicowanie antygenowe szczepów *H.pylori*, może warunkować przebieg kliniczny zakażenia. U większości dzieci immunologicznie kompetentnych zakażenie stymuluje powstanie swoistej odporności komórkowej i humoralnej.

Pierwszą linię obrony organizmu przed atakującymi go ustrojami chorobotwórczymi stanowią fagocyty. Zdolność przekraczania przez drobnoustroje bariery tworzonej przez fagocyty może być jedną z przyczyn przewlekłego przebiegu zakażeń *H.pylori*. W organizmie człowieka w odpowiedzi na zakażenie występuje aktywacja makrofagów, ekspresja antygenów zgodności tkankowej HLA-DR na komórkach nabłonka, ekspresja receptorów typu Toll dla antygeny obecnych na powierzchni komórek prezentujących antygen, takich jak makrofagi, czy komórki dendrytyczne. Makrofagi powstałe z monocytów zaczynają proces eliminacji komórek bakteryjnych w procesie fagocytozy. Komórka żerna w procesie opsonizacji poprzez odpowiednie receptory rozpoznaje określone struktury w ścianie bakterii albo rozpoznaje czynniki opłaszczające komórkę bakteryjną tzw. opsoniny. Najważniejszymi opsoninami są przeciwciała i składniki dopełniacza. Do innych czynników, które opłaszczają mikroorganizmy i spełniają

funkcję opsonin należą; białko C-reaktywne, białko wiążące LPS w ścianie bakterii gram ujemnych i kolektyny. Stwierdzono, że pałeczki *H.pylori* posiadają lektynopodobne struktury powierzchniowe (sialoswoiste hemaglutyniny, białka wiążące glikozoaminy heparanowe), które są miejscem kontaktu dla kolektyń/mannozy i predysponują do procesu lektynofagocytozy .

Pomimo rozwoju silnego odczynu zapalnego w błonie śluzowej zasiedlonej przez *H.pylori* nie zawsze dochodzi do samoistnej eliminacji bakterii z organizmu gospodarza. Zakażenie przybiera najczęściej postać przewlekłą, a zapalenie wywołane przez *H.pylori* utrzymuje się latami. Ewolucja zmian w błonie śluzowej od zakażenia człowieka *H.pylori* do rozwoju wrzodu w trwa kilka, a raka czy chłoniaka żołądka nawet dziesiątki lat. Powikłania przewlekłego zakażenia *H.pylori*, pod postacią raka czy chłoniaka żołądka, dotyczą zwykle populacji ludzi dorosłych.

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 i monitorowanie przebiegu procesu zakażenia, i odpowiedzi immunologicznej chorego.

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorant podjął się oceny stężenia cytokin i markerów stanu zapalnego w ślinie dzieci z/lub bez zakażenia *H.pylori*.

Badaniami objęte zostały dzieci ;

1. z zakażeniem *Helicobacter pylori* i obecnością *H.pylori* w błonie śluzowej żołądka,
2. bez zakażenia *Helicobacter pylori* i obecności *H.pylori* w błonie śluzowej żołądka.

Doktorant z obu w/w grup wyodrębnił dzieci z różnymi objawami klinicznymi i w tych podgrupach analizował, porównywał odpowiedź immunologiczną gospodarza i markery tej odpowiedzi w ślinie.

Doktorant założył, że obecności bakterii *H.pylori* w żołądku gospodarza towarzyszy reakcja zapalna i odpornościowa miejscowa, i uogólniona, która może determinować zakażenie, a także procesy patologiczne w obrębie błony śluzowej jamy ustnej oraz objawy kliniczne ze strony organizmu dziecka.

Materiałem badawczym była ślina dzieci, w której oznaczano stężenie cytokin (TNF-alfa, IL-8) i markerów zapalenia, jak; defensyna neutrofilowa 1 (podjednostka dehydrogenazy) ND-1, białko cząsteczki adhezyjnej sICAM, (Intercellular Adhesion Molecule), kalprotektyna, metaloproteinaza 2, metaloproteinaza -9, laktotransferyna TLR-2.

Z ciekawości badacza zapytam; jaka minimalna ilość śliny była wystarczająca do wykonania tych wszystkich oznaczeń ?

Przedłożona do oceny dysertacja liczy 87 stron tekstu. ilustrowanego 12 rycinami, 23 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 drogi transmisji bakterii *Helicobacter pylori* i jej związku z zapaleniem błony śluzowej żołądka, jak również przegląd wiedzy o *H.pylori*, jej wirulencji, miejscowym i uogólnionym mechanizmie oddziaływania na organizm gospodarza, metodach diagnostyki zakażenia. Szczegółowo zostały również omówione predyktory zapalenia w organizmie oraz skład śliny ludzkiej. Ta część przedstawiona została w sposób jasny i klarowny, świadczący o dobrej znajomości poruszanych przez Doktoranta zagadnień.

W rozdziale materiały i metody badawcze Doktorant dokonał charakterystyki grupy badanej z podziałem na analizowane podgrupy, stosowanych metod badawczych oraz analiz statystycznych.

Badania realizował w grupie 117 dzieci w wieku od 4,6 do 17,8 lat (śr. 13,3 +/- 3,4).

Wartość merytoryczna wykonanych badań nie budzi zastrzeżeń, podobnie jak zastosowane metody obliczeń statystycznych. Wyniki przeprowadzonych badań immunologicznych zostały zaprezentowane i omówione szczegółowo .

W badaniach Doktorant wykazał;

- Objawy kliniczne, jak; bóle brzucha, spadek masy ciała, utrata łaknienia, czy pokrzywka równie często występowały u dzieci z i bez zakażenia *H.pylori*, natomiast niedokrwistość częściej u badanych *H.pylori*(+). (Wskaźniki antropometryczne BMI liczbowo w kg/m^2 były porównywalne, aczkolwiek nie zgodzę się z informacją zawartą w metodyce, że oceny BMI u dzieci dokonujemy w oparciu o wartości referencyjne stałe a nie porównujemy wartości i kanałów centylowych i odchyłeń standardowych – patrz. siatki OLAF).
- U dzieci *H.pylori*(+) w porównaniu do *H.pylori*(-) istotne wyższe stężenia IL-8, defensyny neutrofilowej ND-1, laktotransferyny i TLR-2 w ślinie.
- U dzieci *H.pylori*(+/-) i dzieci *H.pylori*(-) nie różniły się istotnie/były porównywalne stężenia laktotransferyny, kalprotektyny, MMP-2 i MMP-9 w ślinie.

Ponadto Doktorant wykazał korelację dodatnią pomiędzy stężeniem w ślinie;

- IL-8 a białkiem cząsteczki adhezyjnej sICAM ($R = 0,57$, $p=0,003$) u dzieci *H.pylori*(+),

- ND-1 a MMP-2 ($R=0,4$, $p<0,05$) u dzieci *H.pylori*(+),
- sICAM a kalprotektyną u wszystkich badanych
- ND-1 a MMP-2 i MM-9 ($R=0,4$, $p<0,05$) u dzieci *H.pylori*(-)

Porównania w podgrupach dzieci z objawami klinicznymi *H.pylori*(+) w porównaniu do *H.pylori*(-) wykazały ;

- u dzieci z bólami brzucha znamienne wyższe stężenia IL-8, ND-1, TLR-2 w ślinie,
- u dzieci z utratą łaknienia i utratą masy ciała znamienne wyższe stężenia IL-8, TLR-2 .

W metodyce badań Doktorant wspominał o ocenie stanu błony śluzowej jamy ustnej i uzębienia pacjentów przez stomatologa – w wynikach brak odniesienia do tego elementu badania, a przecież świadczy on o miejscowej ekspresji zmian zapalnych i destrukcyjnych.

Dyskusja, w której Doktorant umiejętnie konfrontuje wyniki własne z doniesieniami z piśmiennictwa liczy 9 stron.

Tekst jest napisany poprawnym językiem, aczkolwiek *Helicobacter pylori* pisane jest prostą czcionką a przecież nazwę rodzajową i gatunkową bakterii piszemy kursywą.

Na podkreślenie zasługuje niezwykle staranne opracowanie pracy i graficzne wyników.

Pracę kończy 6 wniosków będących w większości podsumowaniem wyników. Wniosek nr 1 przedstawia wiedzę ogólnie przyjętą, i powinien zostać pominięty. Pozostałe wnioski sformułowane przez Doktoranta dowodzą słuszności hipotezy stawianej przed podjęciem badań.

Autor wykorzystał 136 pozycji piśmiennictwa właściwie dobranych pod względem tematycznym co świadczy, że był dobrze przygotowany teoretycznie do realizacji postawionego zadania badawczego. Piśmiennictwo napisane jest w kolejności cytowania, z dobrze przestrzegana konsekwencją interpunkcyjną i bibliograficzną.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że w przedstawionej mi do recenzji pracy kierunku zaprogramowanych badań odpowiada w pełni potrzebom pogłębiania i aktualizacji wiedzy na temat patomechanizmów procesu zapalnego w zakażeniu *Helicobacter pylori* i poznawania modelu odpowiedzi obronnej organizmu na zakażenie tą bakterią. Program badawczy zaplanowany został szczegółowo, a następnie konsekwentnie realizowany. Praca jest wartościowym opracowaniem, które wykazało immunoregulatorowy, miejscowy mechanizm oddziaływania *H.pylori* na gospodarza już we wrotach zakażenia jakim jest jama ustna.

Reasumując stwierdzam, że powierzona mi do oceny rozprawa pt. „Wybrane markery stanu zapalnego w ślinie dzieci zakażonych *Helicobacter pylori*” jest oryginalnym dorobkiem naukowym Doktoranta i spełnia warunki stawiane pracom doktorskim.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lekarza medycyny Mateusza Zakrzewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 12 sierpnia 2021 r.

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

L. Bąk-Romaniszyn

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