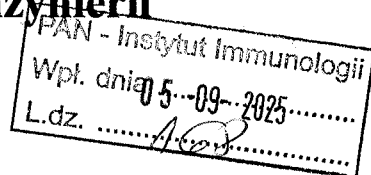




Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii
Nanobiomedycznej

ul. Mickiewicza 2C, 15-089 Białystok, Poland
tel. +48 85 748 54 15, fax +48 85 748 54 16



Białystok, 02-09-2025

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak pt. „Modulacja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez antygeny powierzchniowe *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370” wykonanej pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Sabiny Górskiej w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Zakładu Mikrobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

Praca dotyczy poszukiwania substancji modulujących odpowiedź immunologiczną o działaniu przeciwalergicznym, obecnych w komórkach bakterii *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370. Bifidobakterie wykazują specyficzne dla szczepu zdolności do indukowania produkcji cytokin. Są również źródłem ligandów angażujących między innymi receptory TLR2 i NOD2. Pospolicie występują w mikrobiomie jelitowym człowieka i uczestniczą w utrzymaniu prawidłowej funkcji bariery jelitowej, przebiegu stanu zapalnego, a także funkcji OUN. Wytwarzają także korzystne związki, takie jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Drobnoustroj ten oferuje szereg korzyści zdrowotnych, szczególnie tych zależnych od prawidłowej funkcji bariery śluzówkowej jelit i przebiegu procesów metabolicznych. Szacuje się, że na świecie na alergię cierpi co najmniej 30% populacji, a liczba chorych z tego powodu stale wzrasta. Z tego też względu, badania podstawowe mające na celu identyfikację substancji o działaniu przeciwalergicznym, które mogą pomóc w rozwoju nowych metod terapeutycznych i ich wdrożeniu są bardzo istotne. Przełomem w ich opracowaniu może być identyfikacja naturalnych antygenów bakteryjnych drobnoustrojów mikrobiomu ewolucyjnie związanych z rozwojem i dojrzewaniem układu immunologicznego człowieka. W związku z powyższym, wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak należy uznać za niezmiernie ważny.

Rozprawa doktorska liczy 105 stron i obejmuje: spis skrótów, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki i ich omówienie, dyskusję, wnioski, wykaz cytowanego piśmiennictwa, spis rycin i wykaz dorobku naukowego Doktorantki. Piśmiennictwo wykorzystane w tekście rozprawy obejmuje 132 pozycje, z których znaczna część została opublikowana po 2020 roku.

W rozdziale „Wstęp”, Doktorantka przedstawiła w sposób przejrzysty przegląd literatury na temat mechanizmu alergii jak i możliwości wykorzystania bakterii probiotycznych w leczeniu alergii wziewnych. Na uwagę i wysoką ocenę zasługuje przedstawiony we „Wstępie” opis udziału inflamasyonu NLRP3 w rozwoju chorób układu oddechowego o podłożu alergicznym.

W oparciu o przesłanki zawarte we Wstępie, Doktorantka sformułowała główny cel rozprawy, którym było określenie właściwości immunomodulujących szczepu *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 oraz jego antygenów powierzchniowych (polisacharydów, peptydoglikanu, białek powierzchniowych) w kontekście możliwości wykorzystania ich w terapii schorzeń o podłożu alergicznym. Dodatkowo przedstawiła cztery cele szczegółowe: tj. 1) wyizolowanie, oczyszczenie i określenie właściwości immunomodulujących antygenów powierzchniowych *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 z wykorzystaniem linii ludzkich embrionalnych komórek nerek HEK293, transfekowanych różnymi receptorami oraz naiwnych komórek dendrytycznych i komórek uzyskanych od myszy uwrażliwianych OVA tj. splenocytów; 2) określenie wpływu białek powierzchniowych *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 na rozwój układu immunologicznego u myszy wolnych od patogenów (germ-free); 3) określenie możliwości wykorzystania białek powierzchniowych *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 w leczeniu alergii wziewnej z wykorzystaniem mysiego modelu alergii wziewnej indukowanej OVA; 4) określenie możliwości wykorzystania *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 oraz jego antygenów powierzchniowych w hamowaniu aktywności inflamasyonu NLRP3 z wykorzystaniem modelu aktywacji inflamasyonu NLRP3 w ludzkiej linii komórek monocytarnych THP-1.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka wykorzystwała imponujący zakres metod badawczych. Uzyskane z hodowli w warunkach beztlenowych bakterie *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 poddała inaktywacji i przeprowadziła izolacje i oczyszczanie antygenów powierzchniowych tego drobnoustroju (tj. białek, peptydoglikanów i polisacharydów). Następnie, funkcje biologiczne tych substancji oceniła z wykorzystaniem linii komórkowych HEK293, ludzkich komórek

monocytnych THP-1, szczerzych komórek bazofilnych RBL-2H2, a także splenocytów izolowanych z myszy uwrażliwionych na owoalbuminę. Wpływ białek powierzchniowych *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 na rozwój zapalenia alergicznego i rozwój układu odpornościowego oceniła w mysim modelu alergii wziewnej wywołanej owoalbuminą i z wykorzystaniem myszy wolnych od bakterii (germ-free). W czasie badań z wykorzystaniem zwierząt przeprowadziła izolację i analizę płynu pęcherzykowo-oskrzelowego (BALF), w którym określiła ilość cytokin IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IFN- γ , IL-17A, przeprowadziła także ocenę histopatologiczną płuc wyizolowanych z uśmierconych myszy i analizę poziomu przeciwciał w BALF i krwi obwodowej. Właściwości immunomodulujące antygenów *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 w warunkach *in vitro* określiła również z wykorzystaniem modelu inflamasyonu NLRP3 indukowanego w linii THP-1. Doświadczenia zostały zatwierdzone przez Komisję do Spraw Ochrony i Wykorzystania Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk i wykonane zgodnie ze zgodą o numerze 91-2019. Sposób zaplanowania doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki.

Uwagę zwraca bardzo dokładny opis uzyskanych wyników i bardzo dojrzałe przeprowadzona ich analiza i dyskusja. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań. Ze względu na pilną potrzebę rozwoju nowych metod terapii chorób alergicznych, interesującym elementem przedstawionych danych jest wykazanie, że antygeny powierzchniowe *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 modulują odpowiedź typu T1/T2 w mysim modelu uwrażliwiania OVA, jak również obserwacja z wykorzystaniem mysiego modelu alergii wskazująca, że białka powierzchniowe tego drobnoustroju mogą także odpowiadać za przeciwalergiczne właściwości szczepu dzięki ich właściwościom hamującym odpowiedź typu T2.

Przeprowadzone badania stały się podstawą do sformułowania przez Autorkę sześciu wniosków:

1. Wykazano przeciwalergiczny potencjał *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 na podstawie wyników uzyskanych z uwrażliwiania na owoalbuminę splenocytów.

2. Przebadano potencjał przeciwalergiczny antygenów powierzchniowych *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 oraz wybrano białka powierzchniowe jako antygen o najlepszych właściwościach łagodzących alergię.
3. Wyniki mysiego modelu alergii na owoalbuminę pokazały, że białka powierzchniowe B.370 skutecznie łagodzą objawy alergii poprzez hamowanie wydzielania cytokin w szlaku typu T2 przez komórki płuc i splenocyty oraz łagodzą objawy alergii w obrazie histopatologicznym płuc.
4. Model myszy wolnych od patogenów (germ-free) pokazał neutralny wpływ białek B.370 na rozwój układu odpornościowego myszy.
5. Szczep bakteryjny *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 skutecznie hamuje aktywność inflamasyonu NLRP3 w komórkach THP-1 na poziomie transkrypcji kaspazy-1, oraz produkcji i wydzielania białka IL-1 β .
6. Białka powierzchniowe *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 nie hamują aktywności inflamasyonu NLRP3.

Ważne wątki dyskusji to między innymi wskazanie na wyniki prac innych autorów, które potwierdzają korzystne efekty antygenów powierzchniowych bakterii probiotycznych i spójność obserwacji wpływu białek izolowanych z *Propionibacterium freudenreichii* w mysim modelu alergii pokarmowej wywołanej gliadyną pszeniczną z obserwacją Doktorantki, która wykazała właściwości przeciwalergiczne dla białek B.370, jak również uzasadnienie weryfikacji pionierskich badań będących próbą powiązania przeciwalergicznego działania szczepu bakteryjnego oraz jego antygeny powierzchniowego z mechanizmem hamowania alergii poprzez hamowanie aktywności inflamasyonu NLRP3. W kontekście dyskusji ciekawe byłoby poznanie opinii Doktorantki dotyczącej translacyjnego przełożenia wyników z badań z wykorzystanych modeli mysich na potencjalną odpowiedź układu immunologicznego człowieka, uwzględniając różnice gatunkowe w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej.

Z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić uwagi (nie wpływające na moją wysoką ocenę merytoryczną pracy) odnoszące się do edycji tekstu rozprawy. Dotyczą one między innymi pisowni nazw gatunkowych bakterii, braku mas molekularnych wzorców na żelach z elektroforezy białek, jak również sposobu sformułowania wniosków końcowych.

Stwierdzam, że praca autorstwa mgr Katarzyny Leszczyńskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne. Wysoka wartość merytoryczna pracy upoważnia do zgłoszenia wniosku o wyróżnienie jej właściwą nagrodą ze względu na praktyczną wartość wyników, prawidłowo przygotowany plan doświadczeń i klarowność analizy uzyskanych danych, które z pewnością umożliwią ich opublikowanie w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym.



Signed by /
Podpisano przez:

Robert Antoni Bucki

Date / Data: 2025-
09-02 08:53

prof. dr hab. med. Robert Bucki