



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

# Autoreferat

**Dr Weronika Gonciarz**

**Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki**

Łódź, 2023

## Autoreferat

1. **Imię i nazwisko: Weronika Gonciarz**
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej**

Magistra	Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrona Środowiska, <b>mikrobiologia, specjalność mikrobiologia medyczna i diagnostyka laboratoryjna, czerwiec 2015.</b>
Tytuł pracy magisterskiej: <i>"Standaryzacja metody hodowli pałeczek Helicobacter pylori i kolonizacji nabłonka żołądka na modelu świnek morskich"</i> .	
Doktora	Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrona Środowiska, <b>diedzina nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina nauki biologiczne październik 2020.</b>
Tytuł pracy doktorskiej: <i>„Patogeneza zakażeń Helicobacter pylori na modelu kawii domowych oraz modelach komórkowych in vitro”.</i>	

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki	Od 01.10-2019r.-31.01.2021r. – stanowisko mikrobiologa w grupie pracowników naukowo-technicznych
	Od 01.02.2021r.- obecnie – stanowisko adiunkta w grupie pracowników badawczo dydaktycznych

4. **Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

#### 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

**„Poszukiwanie nowych sygnatur diagnostycznych do oceny przebiegu zakażeń *Helicobacter pylori* oraz preparatów biologicznie aktywnych do przywracania homeostazy bariery nabłonkowej żołądka i immunomodulacji”.**

Osiągnięcie naukowe zatytułowane: „*Poszukiwanie nowych sygnatur diagnostycznych do oceny przebiegu zakażeń *Helicobacter pylori* oraz preparatów biologicznie aktywnych do przywracania homeostazy bariery nabłonkowej żołądka i immunomodulacji.*” obejmuje spójny cykl **6 oryginalnych publikacji** naukowych opublikowanych w czasopismach z listy **JCR z lat 2020-2023**, dotyczących patogenezы zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Helicobacter pylori* w powiązaniu z poszukiwaniem nowych wyznaczników diagnostycznych oraz oceną przydatności wybranych związków biologicznie aktywnych do eliminacji tych zakażeń i przywrócenia homeostazy w żołądku w niszy skolonizowanej przez te drobnoustroje. Sumaryczny IF ujętych prac w osiągnięciu naukowym, podany według roku ich opublikowania wynosi: **28,613** (5-letni IF=32,654) natomiast łączna suma punktów MEiN podana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych z dnia 9 lutego 2021 wynosi **900**. Sumaryczna liczba cytowań prac wynosi 300, a bez autocytowań 187 (wg Web of Science).

**4.2 Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)**

**A1. Gonciarz W.**, Lechowicz Ł., Urbaniak M., Kaca W., Chmiela M. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) for monitoring experimental *Helicobacter pylori* infection and related inflammatory response in guinea pig model. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22, 281. [DOI:10.3390/ijms22010281], [IF<sub>5-letni</sub>=**6,132**; MEiN= **140**].

**Udział habilitanta: 70%**, współautor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, udział w wykonaniu całej części eksperymentalnej (zakażenie *H. pylori* kawii domowych, izolacja materiału od zwierząt, potwierdzanie zakażenia *H. pylori* u kawii domowych, udział w przygotowaniu widm FTIR, analiza widm FTIR), udział w opracowaniu wyników i ich interpretacji, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu.

**A2. Gonciarz W.**, Lechowicz Ł., Urbaniak M., Rechcinski T., Chalubiński M., Broncel M., Kaca W., Chmiela M. Searching for serum biomarkers linking coronary heart disease and *Helicobacter pylori* infection using infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Scientific Reports*. **2022**, 12, 18284. [DOI:10.1038/s41598-022-23191-z], [IF<sub>5-letni</sub>= **5,516**; MEiN= **140**].

**Udział habilitanta: 70%**, współautor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, udział w wykonaniu całej części eksperymentalnej, (przygotowanie i analiza widm FTIR), udział w

opracowaniu wyników i ich interpretacji, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu, podwójna afiliacja.

**A3. Gonciarz W.**, Lechowicz Ł., Urbaniak M., Kaca W., Chmiela M. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Artificial Neural Networks Applied to Investigate Quantitative Changes of Selected Soluble Biomarkers, Correlated with *H. pylori* Infection in Children and Presumable Consequent Delayed Growth. *Journal of Clinical Medicine*. **2020**, 9, 3852. [DOI:10.3390/jcm9123852], [IF<sub>5-letni</sub> = **4,566**; MEiN=**140**].

**Udział habilitanta: 70%**, współautor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, udział w wykonaniu całej części eksperymentalnej, (udział w przygotowaniu widm FTIR, analiza widm FTIR), udział w opracowaniu wyników i ich interpretacji wyników, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu.

**A4. Gonciarz W.**, Piątczak E., Płoszaj P., Gościński G., Chmiela M. *Salvia cadmica* extracts rich in polyphenols neutralize a deleterious effects of oxidative stress driven by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in cell cultures of gastric epithelial cells or fibroblasts. *Industrial Crops and Products*. **2022**, 178, 114633. [DOI:10.1016/j.indcrop.2022.114633]. [IF<sub>5-letni</sub> = **5,645**; MEiN= **200**].

**Udział habilitanta: 70%**, współautor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, wykonanie całej części eksperymentalnej *in vitro*, opracowanie wyników i ich interpretacja, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu.

**A5. Gonciarz W.**, Piątczak E., Chmiela M. The influence of *Salvia cadmica* Boiss. extracts on the M1/M2 polarization of macrophages primed with *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in conjunction with NF-kappa B activation, production of cytokines, phagocytic activity and total DNA methylation. *Journal of Ethnopharmacology*. **2023**, 310, 116386. [DOI:10.1016/j.jep.2023.116386]. [IF<sub>5-letni</sub> = **5,195**; MEiN= **140**].

**Udział habilitanta: 75%**, autor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, wykonanie całej części eksperymentalnej *in vitro*, opracowanie wyników i ich interpretacja, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny.

**A6. Gonciarz W.**, Chyb M., Chmiela M. *Mycobacterium bovis* BCG increase the selected determinants of monocyte/macrophage activity, which were diminished in response to gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*. **2023**, 13, 3107. [IF<sub>5-letni</sub> = **5,516**; MEiN= **140**]. [DOI:10.1038/s41598-022-23191-z].

**Udział habilitanta: 80%**, autor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, wykonanie całej części eksperymentalnej *in vitro*, opracowanie wyników i ich interpretacja, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny.

**Tabela 1 Wskaźniki: Impact Factor** (podano wartości IF dla czasopism zgodnie z rokiem opublikowania pracy, oraz 5-letni; **punkty MEiN** (podano wartości zgodnie z rokiem opublikowania wg wykazu z dnia 9.02.2021) oraz **liczba cytowań** (na podstawie bazy *Web of Science* z dnia 06.05.23r.) **publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

Nr publikacji	IF zgodny z rokiem opublikowania	IF Bieżący	IF 5-letni	Punkty MEiN zgodne z rokiem opublikowania	Indeks cytowań (WoS) z dnia 06.05.23r.
<b>A1</b>	4,183	6,628	6,208	140	7
<b>A2</b>	5,688	5,098	4,810	140	16
<b>A3</b>	3,998	5,516	4,996	140	1
<b>A4</b>	4,244	6,508	6,449	200	2
<b>A5</b>	5,195	4,347	5,195	140	0
<b>A6</b>	3,998	5,516	4,996	140	0
<b>Suma</b>	<b>27,280</b>	<b>28,613</b>	<b>32,654</b>	<b>900</b>	<b>26</b>

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w **Załączniku 4**.

Prowadzone przeze mnie prace naukowe, stanowiące spójny cykl publikacji, pt. **„Poszukiwanie nowych sygnatur diagnostycznych do oceny przebiegu zakażeń *Helicobacter pylori* oraz preparatów biologicznie aktywnych do przywracania homeostazy bariery nabłonkowej żołądka i immunomodulacji”** finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach kierowanego przeze mnie grantu Minatura 5 pt. „Ocena *in vitro* właściwości immunomodulacyjnych ekstraktów *Salvia cadmica* Boiss. wobec makrofagów, w kontekście wspomaganie eradykacji zakażenia *Helicobacter pylori*, w następstwie „treningu odpornościowego”, nr DEC-2021/05/X/NZ6/00105 oraz w ramach dwóch projektów wewnętrznych Uniwersytetu Łódzkiego z dotacji: Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza, Granty dla Młodych Badaczy, pt.: „Rola LPS *H. pylori* w utrwalaniu reakcji zapalnej w nabłonku żołądka poprzez wykluczenie alarmowej IL-33”, nr 25/IDUB/MLOD/2021 oraz Granty na Zwiększenie Potencjału Aplikacyjnego pt.: „Opracowanie biopolimeru chitozanowego z prątkami szczepionkowymi *Mycobacterium bovis* BCG-onko o właściwościach immunomodulujących, do wspomaganie odpowiedzi odpornościowej przeciwko *Helicobacter pylori*”, nr 15/GNZPA/2022. Część

badania była finansowana z dotacji na działalność statutową Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego.

#### 4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

##### **Wprowadzenie do tematyki badań**

##### **Patogeneza zakażeń *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* to Gram-ujemne, mikroaerofilne, biegunowo urzęsione pałeczki, które po raz pierwszy zostały wyizolowane z błony śluzowej żołądka pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym tego narządu, w 1983 r. przez Warrena i Marshalla (**Warren i Marshall 1983**). Bakterie te występują powszechnie w populacji ludzi na całym świecie, choć wykazano znaczne zróżnicowanie częstości zakażeń w poszczególnych krajach, grupach etnicznych i społecznych. Głównym rezerwuarem tych bakterii jest człowiek, choć przypuszcza się, że mogą nim być także zwierzęta mające kontakt z ludźmi (psy, koty, świnie, małpy) (**Brown i wsp. 2002**). Do zakażeń dochodzi drogą ustno-ustną, kałowo-ustną lub żołądkowo-ustną, a ich częstość zależy od warunków społeczno-ekonomicznych i sanitarnych w danej populacji (**Allaker i wsp. 2002**). Do czynników sprzyjających szerzeniu się zakażeń *H. pylori* należą m.in. niedożywienie, nadużywanie używek oraz niedobór witamin w diecie (**Karczewska i wsp. 2009**). W krajach o wysokim statusie socjalno-ekonomicznym, zakażenie *H. pylori* występuje u 20 do 40% populacji, natomiast w krajach o niskim stanie sanitarno-epidemiologicznym odsetek zakażeń może wynosić nawet od 80 do 100% (**Kotilea i wsp. 2019**). Do zakażenia *H. pylori* dochodzi zwykle w okresie dzieciństwa i jeśli nie jest ono leczone może utrzymywać się przez wiele lat, a nawet całe życie osobnicze nie dając objawów klinicznych lub ujawniać się, choć czynniki determinujące wystąpienie objawów klinicznych nie są dobrze poznane. Przewlekły charakter zakażeń *H. pylori* przyczynia się do powstawania zmian chorobowych, które związane są z mechanizmami adaptacyjnymi tych bakterii do zasiedlania żołądka i namnażania się w jego kwaśnym środowisku, a także negatywną modulacją odpowiedzi odpornościowej gospodarza w zakresie procesu fagocytozy, aktywności cytotoksycznej naturalnych komórek zabijających (NK, *natural killer cells*) oraz odpowiedzi efektorowej limfocytów T (**Chmiela i wsp. 1997, Grębowska i wsp. 2008, Allen i wsp. 2007, Paziak-Domańska i wsp. 2000, Rudnicka i wsp. 2015, Miszczyk i wsp. 2014, publikacja Bb7**). Działanie takie może być spowodowane czynnikami wirulencji tych bakterii, ale także pojawiać się w następstwie mimikry molekularnej, która sprawia, że bakterie te są słabo rozpoznawane przez komórki immunokompetentne gospodarza (**Appelmeik i wsp. 1997; publikacje: Ba4; Ba5 C10, Chmiela i Michetti 2006, Chmiela i wsp. 1997, Matusiak i wsp. 2016**).

Pałeczki *H. pylori* posiadają wiele czynników wirulencji, które determinują proces kolonizacji nabłonka żołądka, rozwój reakcji zapalnej oraz powstawanie zmian chorobowych. Do kluczowych należą: rzęski warunkujące zdolność ruchu i przemieszczanie się tych bakterii w gęstym śluzie żołądka, ureaza neutralizująca kwaśne pH soku żołądkowego, liczne adhezyny - białka błony zewnętrznej (OMP, *outer membrane proteins*) warunkujące przyleganie bakterii do nabłonka żołądka, onkogenne białko CagA (*cytotoxin-associated gene A antigen*) powiązane z systemem sekrecyjnym typu IV-T4SS (*type IV secretion system*), toksyna wakuolizująca - VacA (*vacuolating cytotoxin A*) oraz lipopolisacharyd - LPS (*lipopolysaccharide*), posiadający właściwości immunomodulujące **(Alm i wsp. 2000, Bor-Shyang i wsp. 2006, Ishijima i wsp. 2011, Krzysiek-Maczka i wsp. 2013, Matsuo i wsp. 2017, Rudnicka i wsp. 2019, publikacja Bb5)**.

W kolonizacji szczególnie podkreślana jest rola adhezyny BabA (BabA, *blood antigens binding adhesin*), wiążącej determinanty antygenowe Lewis b (Le b) w błonie śluzowej żołądka oraz adhezyny SabA (SabA, *sialic acid binding adhesin*), która wiąże sialowane determinanty Lewis X (LeX) **(Mahdavi i wsp. 2002, Aspholm i wsp. 2006)**. Pałeczki *H. pylori* wykorzystują mechanizm zmienności fazowej w zakresie wytwarzania obu tych adhezyn, co umożliwia im naprzemienne przybliżanie się do lub oddalanie od nabłonka, co gwarantuje odpowiednio dopływ składników odżywczych lub ochronę przed działaniem na bakterie komórek zapalanych gospodarza infiltrujących miejsce kolonizacji **(Wirth i wsp. 1996, Gibson i wsp. 1998)**.

U osób z niedoborem mucyny 5 (MUC5AC) w śluzie żołądkowym i Le b- ujemnych wiązanie BabA z komórkami nabłonkowymi jest zahamowane. BabA działa nie tylko jako adhezyna ale nasila również translokację do komórek nabłonkowych żołądka jednego z kluczowych czynników wirulencji *H. pylori* jakim jest białko CagA, co sprzyja rozwojowi zapalenia żołądka o ciężkim przebiegu **(Marcos i wsp. 2008)**. Pałeczki *H. pylori* w pierwszej fazie zakażenia nasilają wytwarzanie MUC5AC zawierającej determinanty LeX i w ten sposób wpływają na proces adhezji. Nie wyklucza się, że nasilenie wytwarzania MUC5AC jest mechanizmem obronnym gospodarza w odpowiedzi na ostrą fazę zakażenia, jednakże sprzyjającym kolonizacji *H. pylori* **(publikacja Ba1)**. Po związaniu ze śluzem żołądkowym bakterie te wydzielają mucynazy, a także tioredoksynę, które destabilizują wiązanie dwusiarczkowe mucyn, co skutkuje przedostaniem się bakterii do warstwy komórek nabłonka żołądka **(Smith i wsp. 1994, Windle i wsp. 2000)**.

Jednym z kluczowych czynników wirulencji *H. pylori* jest lipopolisacharyd (LPS) występujący w błonie zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. LPS *H. pylori*, charakteryzuje się o wiele słabszymi właściwościami pirogennymi i immunogennymi niż typowy LPS bakterii Gram-ujemnych, co jest związane ze słabszą acylacją i fosforylacją lipidu A **(Moran i wsp. 2011)**. Choć LPS

*H. pylori* stymuluje wytwarzanie jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B - NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) i interleukiny (IL)-8 o działaniu chemotaktycznym, przez komórki nabłonka żołądka i komórki odpornościowe, to w porównaniu z LPS typowych enteropatogenów jest słabszym aktywatorem komórek wrodzonej odpowiedzi odpornościowej ponieważ posiada większe powinowactwo do receptorów Toll-podobnych (*Toll-like receptors*) typu 2 - TLR-2, niż TLR-4, co skutkuje słabszą aktywacją ścieżki sygnałowej TLR-4 zależnej. Spośród cytokin stymulowanych przez LPS *H. pylori*, IL-1 $\beta$  oraz czynnik martwicy guzów TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factos alpha*) hamują aktywność komórek okładzinowych żołądka do wydzielania kwasu solnego, co skutkuje podwyższeniem pH, sprzyjając kolonizacji błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* (Smith i wsp. 2003). Unikatową cechą LPS *H. pylori* jest występowanie w jego części O-swoistej determinantów antygenowych LeX/Y, które mogą pośredniczyć zarówno w adhezji *H. pylori* do nabłonka żołądka, jak i ograniczać odpowiedź odpornościową gospodarza wskutek mimikry antygenowej (Moran i wsp. 2011). Tu również, podobnie jak w przypadku adhezyn BabA/SabA, ważną rolę odgrywa zmienność antygenowa izolatów w zakresie determinantów antygenowych Le X/Y (Heneghan i wsp. 2000). Mimikrę antygenową wykazano także w strukturze ureazy *H. pylori* i receptora chemokinowego na komórkach nabłonka żołądka (Konieczna i wsp. 2012). Wykazano również interakcje przeciwciał przeciwko białku CagA *H. pylori* a śródbłonkiem naczyniowym (Franceschi i wsp. 2002).

Podczas zakażenia wysoce zjadliwe szczepy *H. pylori* wytwarzają toksynę wakualizującą VacA, a także onkogenne białko CagA związane z cytotoksyną (Covacci i wsp. 1993, Xiang i wsp. 1993, Chambers i wsp. 2013). Toksyna VacA, w środowisku amoniaku, powoduje powstawanie kwaśnych wodniczek w komórkach nabłonka żołądka, limfocytach T i komórkach okładzinowych. Toksyna ta ulega aktywacji w niskim pH żołądka, a następnie wchodzi w interakcję z błoną lipidową komórek docelowych tworząc w niej pory umożliwiające przepływ jonów chlorkowych (Ivie i wsp. 2008). Efektem tego jest wakuolizacja komórki oraz uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, co prowadzi do aktywacji szlaku apoptotycznego. Proces ten przyczynia się do niszczenia komórek nabłonka żołądka oraz osłabienia odpowiedzi odpornościowej poprzez m.in. hamowanie fagocytozy oraz prezentacji antygenów przez komórki prezentujące antygen APC (*antigen presenting cells*) i w następstwie tego proliferacji limfocytów T (*antigen presenting cells*) (Molinari i wsp. 1998, Betten i wsp. 2001, Kuklińska i wsp. 2011, Yang i wsp. 2020).

Cytotoksyna CagA to silnie immunogenne białko o masie 120–145kDa, które jest kodowane w obrębie wyspy patogenności – PAI (*pathogenicity island*) CagA, razem z systemem wydzielniczym T4SS (Covacci i wsp. 1993, Xiang i wsp. 1993, Cover i wsp. 2020). System T4SS umożliwia bezpośredni transport białka CagA do wnętrza komórki poprzez oddziaływanie z integryną  $\beta$ 1, a także fosfatydyloseryną gospodarza. Białko CagA jest powiązane z ostrym przebiegiem reakcji zapalnej



i podwyższonym ryzykiem rozwoju raka żołądka. Oddziałując na białka komórek gospodarza moduluje ich fenotyp przez wpływ na polarność, proliferację i ruchliwość. W formie nieufosforylowanej osłabia ścisłe połączenia między komórkami nabłonka oraz powoduje utratę polarności komórek. Natomiast ufosforylowane białko CagA zaburza strukturę cytoszkieletu komórki eukariotycznej, zdolność przylegania do siebie komórek nabłonka oraz ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne (**Segal i wsp. 1999, Backert i wsp. 2001, Kuklińska i wsp. 2011, Chmiela i wsp. 2017, Yang i wsp. 2020**). W badaniach własnych Zespołu KliBI wykazano, że białko CagA hamuje proliferację limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej dawców w hodowlach *in vitro*, co pozwala sugerować, że *in vivo* takie działanie może skutkować zaburzeniem ekspansji limfocytów i ograniczeniem ich funkcji efektorowej. Działanie takie wykazuje także VacA, jakkolwiek jest ono słabiej wyrażone niż działanie CagA (**Paziak-Domańska i wsp. 2002**).

Bezpośrednie interakcje żywych pałeczek *H. pylori* z komórkami nabłonkowymi żołądka, oddziaływanie na te komórki komponentów *H. pylori* wydzielanych do środowiska lub wprowadzanych do komórek gospodarza skutkują uszkodzeniem nabłonka i indukcją reakcji zapalnej, początkowo ostrej, a następnie przewlekłej. Konsekwencją zakażenia może być powstawanie wrzodów żołądka lub dwunastnicy, a nawet raka żołądka. Światowa Organizacja Zdrowia - WHO (*World Health Organization*) sklasyfikowała zakażenie *H. pylori* jako karcinogen klasy I, ponieważ zwiększa ono znacząco ryzyko wystąpienia raka żołądka i drobnokomórkowego chłoniaka tkanki limfatycznej - MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) (**Raport WHO, 1994**). Od chwili zidentyfikowania *H. pylori* jako czynnika etiologicznego zapalenia błony śluzowej żołądka oraz towarzyszących mu schorzeń, dokonał się znaczący postęp w zakresie poznania zarówno mechanizmu zakażenia, jak i wzajemnych interakcji gospodarz-patogen. Jednakże wiedza na temat przyczyn zróżnicowanego przebiegu zakażeń *H. pylori* jest wciąż niewystarczająca. Na rozwój i przebieg zakażenia wpływ mają zarówno podatność osobnicza gospodarza, jak i zjadliwość szczepu *H. pylori*.

Coraz więcej danych z badań populacyjnych oraz badań przeprowadzonych na modelach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* wskazuje, że długotrwała kolonizacja organizmu gospodarza przez pałeczki *H. pylori* może przyczyniać się do rozwoju ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej, a ta do rozwoju chorób poza układem pokarmowym takich jak: choroba niedokrwienna serca - ChNS, niedowzrost u dzieci, reumatoidalne zapalenie stawów - RZS (*rheumatoid arthritis*), pierwotna małopłytkowość immunologiczna - ITP (*primary immunologic thrombocytopenia*), niedokrwistość z niedoboru żelaza - IDA (*iron deficiency anemia*), niedobór witaminy B12, cukrzyca, zaburzenia dermatologiczne oraz neurologiczne (**publikacja Ba5; C10, De Block i wsp. 1999, Tamer i wsp. 2009, Tiwari i wsp. 2009, Arabski i wsp. 2010, El-Eshmawy i wsp. 2011, Stawerska i wsp. 2015, Matusiak i wsp. 2016**). Współudział komponentów *H. pylori* w etiologii chorób rozwijających się poza

przewodem pokarmowym może być determinowany destabilizacją bariery nabłonkowej żołądka oraz śródbłonka naczyniowego, co stwarza możliwość oddziaływania ogólnoustrojowych komponentów tych bakterii nie tylko na komórki tych barier, ale także na komórki odpornościowe gospodarza. Nie wyklucza się także podłoża autoimmunizacyjnego w rozwoju chorób ogólnoustrojowych wskutek wspomnianej już wcześniej mimikry antygenowej, która oznacza podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pomiędzy strukturami II-rzędowymi mikroorganizmu a cząsteczkami występującymi w organizmie gospodarza, co w konsekwencji może prowadzić do produkcji autorekatorywnych przeciwciał, mogących przyczynić się do rozwoju chorób o podłożu zapalnym i/lub autoimmunologicznym. Takie podobieństwo może występować pomiędzy liniowymi sekwencjami aminokwasów, strukturą przestrzenną białek, lub łącznie (**publikacja Ba5**). W badaniach Zespołu KliBI wykazano, że (**publikacja Ba5**) podobieństwo antygenowe między białkiem szoku cieplnego Hsp (*heat shock protein*) – Hsp B *H. pylori* a białkiem Hsp 60 człowieka, a także między determinantami LeX/Y w LPS *H. pylori* a takimi determinantami występującymi na komórkach gospodarza: erytrocytach, granulocytach, komórkach nabłonkowych i w śródbłonku naczyniowym, może przyczynić się do wytwarzania u pacjentów zakażonych *H. pylori* przeciwciał krzyżoworeagujących (**Matusiak i wsp. 2016, publikacja Ba5, C10, Grębowska i wsp. 2008**). Wytwarzanie takich przeciwciał potwierdzono na modelu kawii domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori* (**publikacja Ba5, C10**). We wcześniejszych badaniach wykazano, że u pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* poziom przeciwciał przeciwko antygenom *H. pylori* jest nawet wyższy niż u pacjentów z zapaleniem błony śluzowej żołądka na tle zakażenia tymi bakteriami, ale również wyższy jest poziom kompleksów immunologicznych zawierających w swoim składzie antygeny Lewis X/Y (**Chmiela i wsp. 1998, Grębowska i wsp. 2010**). Jednak, uzyskanie odpowiedzi na pytania czy i jak często autoprzeciwciała indukowane w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* są zaangażowane w procesy patologiczne wymaga dalszych badań.

- **Rozwój procesów odpornościowych gospodarza w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* oraz mechanizmy ich unikania przez te bakterie**

W pierwszym etapie zakażenia antygeny powierzchniowe *H. pylori* są rozpoznane przez receptory toll-podobne – TLR (*Toll-like receptors*) obecne na komórkach nabłonkowych żołądka oraz na komórkach prezentujących antygeny – APC (*antigen presenting cells*), które infiltrują nabłonek żołądka, co skutkuje aktywacją czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i AP-1 (*activator protein 1*), wytwarzaniem cytokin prozapalnych takich jak IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ , które początkowo werbują i aktywują granulocyty obojętnochłonne, makrofagi, komórki tuczne oraz komórki dendrytyczne (KD), a w późniejszym etapie zakażenia także limfocyty pomocnicze – Th (*T helper*) 1. Napływające komórki odpowiedzi nieswoistej dostarczają więcej IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 oraz IL-12, które pobudzają limfocyty Th1 do produkcji interferonu gamma - IFN- $\gamma$  (*interferon-gamma*). Pomimo obecności tej cytokiny w środowisku makrofagi są słabo

aktywowane i nieefektywne w eliminacji *H. pylori*. Jest to prawdopodobnie spowodowane przez pewne czynniki wirulencji *H. pylori*, które hamują proces fagocytozy. Wykazano, że takie działanie mogą powodować powierzchniowe sialoswoiste adhezyny *H. pylori* oraz białka wiążące heparynę lub siarczan heparanu, które blokują ważne dla procesu fagocytozy receptory powierzchniowe na komórkach żernych **(Chmiela i wsp. 1997)**. Wyniki badań Zespołu KliBI wskazują, że również LPS *H. pylori* hamuje zdolność pochłaniania *H. pylori* przez fagocyty **(Grębowska i wsp. 2008)**. Natomiast z badań Allen i wsp. **(Allen i wsp. 2007)**, wiadomo, że toksyna VacA w środowisku ureazy powoduje zamykanie *H. pylori* w dużych wodniczках tzw. megasomach, w których bakterie te przeżywają wewnątrzkomórkowo **(Allen i wsp. 2007)**.

Czasowa wewnątrzkomórkowa lokalizacja pałeczek *H. pylori* w komórkach nabłonkowych żołądka i makrofagach sugeruje mobilizację i działanie naturalnych komórek zabijających - NK (*natural killer*), o silnych właściwościach cytotoksycznych. W badaniach Zespołu KliBI wykazano jednak, że u osób zakażonych *H. pylori* mniej liczna jest populacja komórek NK w krążeniu. Ponadto, w badaniach *in vitro* na komórkach NK izolowanych z frakcji leukocytów krwi obwodowej dawców wykazano, że LPS *H. pylori* hamuje ekspansję i aktywność cytotoksyczną komórek NK, co potencjalnie może mieć wpływ na utrwalenie zakażenia **(Rudnicka i wsp. 2012; 2015)**. Biorąc pod uwagę znaczenie pierwszej linii obrony organizmu gospodarza w odpowiedzi na czynniki zakaźne wydaje się, iż przywrócenie aktywności zwłaszcza komórek żernych mogłoby znacząco wpłynąć na ograniczenie zakażenia *H. pylori*.

Odpowiedź adaptacyjna swoista przeciwko antygenom *H. pylori* jest prawdopodobnie incjowana w śluzówkowym układzie odpornościowym (kępkach Payera) w jelicie, gdzie docierają antygeny *H. pylori* uwalniane z tych bakterii podczas ich lizy. Efektorowa odpowiedź adaptacyjna swoista przeciwko *H. pylori* charakteryzuje się napływem do miejsca zakażenia limfocytów T pomocniczych CD4+, w mniejszym stopniu cytotoksycznych limfocytów TCD8+ oraz limfocytów B. U pacjentów z chorobą wrzodową żołądka wywołaną przez *H. pylori* dominują limfocyty pomocnicze Th1 i cytokiny prozapalne: IL-12, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Natomiast w przewlekłym zapaleniu błony śluzowej żołądka cytokiny Th1 są równoważone przez cytokiny Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 IL-10). Wzrasta również produkcja IL-17 przez limfocyty Th17, która stymuluje komórki nabłonkowe, komórki śródbłonka naczyniowego oraz fibroblasty do wydzielania cytokin pobudzających napływ neutrofilów i ich aktywację tj.: IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6, co sprzyja tworzeniu niszy wrzodowej przez enzymy wydzielane do środowiska przez te komórki **(Korn i wsp. 2009)**.

W odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* u większości osób wytwarzane są przeciwciała przeciwko białkom *H. pylori*: wysoce specyficznym (CagA, VacA), specyficznym (ureaza) oraz niespecyficznym (białka Hsp, flagellina) **(Czkwianiec i wsp. 1997, Rechciński i wsp. 1997, Wiśniewska i wsp. 2002,**

**Chmiela i wsp. 2003**). We wczesnej fazie zakażenia dominują przeciwciała klasy IgM natomiast IgA i IgG świadczą o zakażeniu przewlekłym (**Matusiak i wsp. 2016**). Jednak produkowane przeciwciała nie są skuteczne w zwalczaniu zakażenia *H. pylori*, ze względu na miejsce bytowania bakterii w nabłonku żołądka. Wykazano, że komponenty *H. pylori* hamują wytwarzanie przez komórki nabłonkowe żołądka komponenty sekrecyjnej przeciwciał wydzielniczych klasy IgA, co ogranicza działanie tych przeciwciał na powierzchnia błon śluzowych (**Birkholz i wsp. 1998**).

- **Zasady rutynowej diagnostyki zakażeń *H. pylori* i potrzeba poszukiwania nowych sygnatur diagnostycznych**

Rozpowszechnienie zakażeń *H. pylori* w populacji ludzkiej, ich przewlekły charakter, oraz poważne konsekwencje tych zakażeń były przesłanką do opracowania testów diagnostycznych, mających na celu potwierdzenie lub wykluczenie zakaźnego podłoża zapalenia błony śluzowej żołądka, wrzodów żołądka lub dwunastnicy. W diagnostyce zakażeń *H. pylori* stosowane są zarówno metody inwazyjne jak i nieinwazyjne. Testy inwazyjne oparte są na pobraniu podczas gastroskopii wycinków tkanki żołądka do badania histopatologicznego celem oceny stanu zapalnego oraz wykrycia „*Helicobacter*-podobnych organizmów” - HLO, a także założenia hodowli i wykonania tzw. „szybkiego testu ureazowego”, do wykazania aktywności ureazy wytwarzanej przez pałeczki *H. pylori* kolonizujące nabłonek żołądka. Zestaw tych testów stanowi tzw. „złoty standard” w diagnostyce zakażeń *H. pylori* (**Logan 1998, Malfertheiner i wsp. 2012**). Do testów nieinwazyjnych pobierane są krew lub kał w celu wykrycia, odpowiednio swoistych przeciwciał przeciwko antygenom *H. pylori*, które mogą być pomocne w potwierdzaniu zakażenia *H. pylori*, lub antygenów tych bakterii w próbkach kału. Wg niektórych źródeł, u dzieci, testy diagnostyczne na obecność antygenów *H. pylori* w kale umożliwiają ocenę zakażenia bez potrzeby wykonania endoskopii (**Bąk-Romaniszyn i Małecka-Panas 2007**). Według rekomendacji European Consensus Group - ECG podjętych w 2002 r., w Maastricht, które są cyklicznie weryfikowane, do potwierdzenia zakażenia *H. pylori* powinny być stosowane: ureazowy test oddechowy <sup>13</sup>C-UTB oraz preparat histopatologiczny z wycinka błony śluzowej żołądka (**Malfertheiner i wsp. 2002**). Ureazowy test oddechowy został przystosowany do podawania minimalnej dawki mocznika znakowanego <sup>13</sup>C w formie kapsułki, co zwiększa bezpieczeństwo badania i ułatwia jego przeprowadzenie (**Bielański i Konturek 1996**).

Pomimo, iż opracowane zostały wiarygodne testy diagnostyczne do wykrywania zakażenia *H. pylori* są dostępne testy do różnicowania przebiegu zakażeń *H. pylori*, lub wskazywania ich konsekwencji ogólnoustrojowych, co biorąc pod uwagę przewlekły charakter takich zakażeń byłoby bardzo pomocne zarówno w celach diagnostycznych, jak i terapeutycznych.

- **Aktualne zalecenia do leczenia zakażeń *H. pylori* i problem antybiotykooporności**

W leczeniu zakażeń *H. pylori* do niedawna rekomendowana była potrójna terapia złożona z inhibitora pompy protonowej - PPI (*proton-pump inhibitor*), klarytromycyny i amoksycyliny/lub metronidazolu, która zwykle trwa 7 dni (**Malfertheiner i wsp. 2012**). Jakkolwiek, w miarę stosowania tej terapii zaproponowano kilka schematów leczenia zakażeń *H. pylori* z podziałem na podstawowe i alternatywne (Tabela 2). Zmianie ulega zestaw stosowanych antybiotyków, co poprzedzone jest wykazaniem narastającej częstości izolacji szczepów opornych na określony antybiotyk (**Thung i wsp. 2015, Li i wsp. 2020**).

**Tabela 2.** Przykładowe podstawowe i ratunkowe schematy leczenia zakażeń *H.pylori*. (**Thung i wsp. 2015**).

Rodzaj terapii	Rekomendacje	Antybiotyki	Czas trwania
Terapia potrójna	Stosowanie na obszarze o niskiej oporności na klarytromycynę lub u pacjenta, który nie miał styczności z makrolidami	Klarytromycyna 500 mg 2x Amoksycylina 1000 mg 2x Omeprazol stand. dawk. 1x	10-14 dni
Terapia poczwórna	Wprowadzana w przypadku nieskuteczności terapii potrójnej	Bizmut 525 mg 4x. Tetracyklina 500 mg 4x. Metronidazol 250 mg 4x Omeprazol stand. dawk 1x	10-14 dni
Terapia sekwencyjna	Wymaga dalszej oceny	Pierwsze 5 dni: Omeprazol stand. dawk 1x. Amoksycylina 1000 mg 2x Następne 5 dni: Omeprazol stand. dawk 1x Klarytromycyna 500 mg 2x. Metronidazol 500 mg 2x	10 dni
LOAD ( <i>levofloxacin, omeprazole, nitazoxanide, doxycycline</i> )	Wymaga dalszej oceny	Lewofloksacyna 250 mg 1x rano Omeprazol 40 mg 1x rano Nitazoksanid 500 mg 1x Doksycyklina 100 mg 1x wieczór	7-10 dni
1x-raz na dobę, 2x-dwa razy na dobę, 4x- cztery razy na dobę			

Antybiotyki, na które szczepy kliniczne *H. pylori* najczęściej wykazują oporność to amoksycylina, klarytromycyna, metronidazol i lewofloksacyna. Wykazano korelację pomiędzy wzrostem częstości zakażeń *H. pylori* w populacji a zwiększoną częstością izolacji szczepów antybiotykoopornych. Przykładowo, liczba szczepów opornych na lewofloksacynę wynosiła w Japonii: w 1996 r. – 1,8%, a w 2008 r. – 27,1%; w Chinach: w 2000 roku - 17,8%, a w 2014 roku – 52,6%; w Korei: w 2005 roku - 11%, a w 2009 roku - 60%. Oporność szczepów na metronidazol w Europie waha się od 20% do 40%,

w zależności od kraju. W Meksyku, w 2001 roku odsetek ten wynosił 76,3%. Odnotowano również, że oporność szczepów na lewofloksacynę waha się od 20 do 40%: Chiny 34,5, Włochy 22,1%, USA (31,9%), Portugalia (20,9%) **(Dzierżanowska-Fangrat i wsp. 2005, Thung i wsp. 2015, Boyanova i wsp. 2002, Mnich i wsp. 2018, Krzyżek i wsp. 2020)**.

Tendencja zwiększającej się antybiotykooporności izolatów klinicznych *H. pylori*, a także wysoka częstość zakażeń w populacji stanowią poważny problem medyczny. Są to przesłanki do poszukiwania nowych formułacji do wspomagania leczenia zakażeń *H. pylori*. Rozważne są bakterie probiotyczne **(Dore i wsp. 2019)** oraz preparaty pochodzenia roślinnego jak chociażby preparat HelicoFood (VITADIET SP. Z O.O. Łódź, Polska). Od wielu lat trwają również badania nad opracowaniem szczepionki. Jakkolwiek, znaczna część zakażeń *H. pylori* ma charakter bezobjawowy, w związku z powyższym szczepionka powinna być przeznaczona dla grup podwyższonego ryzyka wystąpienia poważnych konsekwencji zdrowotnych w związku z zakażeniem lub mieć charakter leczniczy.

- **Potrzeba poszukiwania alternatywnych metod wspomagających leczenie zakażeń *H. pylori***

W 2018 WHO wydało komunikat, że oporność *H. pylori* na antybiotyki, w tym amoksycylinę, klarytromycynę, metronidazol i lewofloksacynę osiągnęła alarmujący poziom na całym świecie, co ma ogromny wpływ na skuteczność leczenia **(Savoldi i wsp. 2018, Bujanda i wsp. 2021)**. Ponadto bakterie te są trudne do eliminacji ponieważ wymykają się spod kontroli mechanizmów odpornościowych gospodarza, co skutkuje przewlekłym zakażeniem i rozwojem patologicznej reakcji zapalnej. Lokalnie w tkance żołądka *H. pylori* destabilizuje barierę nabłonka żołądka wskutek bezpośredniego kontaktu lub poprzez czynniki wirulencji, rozpuszczalne lub wprowadzane do komórek gospodarza. Kolonizacja nabłonka przez te bakterie skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego i apoptozy komórek **(Mnich i wsp. 2016, publikacja Ba2, Ba4, Bb11)**. Komponenty *H. pylori* zmniejszają zdolność pochłaniania tych bakterii przez fagocyty **(Chmiela i wsp. 1997, Ramarao i Meyer, 2001, Allen 2007, Grebowska i wsp. 2008)**, aktywność cytotoksyczną i ekspansję komórek NK **(Rudnicka i wsp. 2015)**, a także proliferację limfocytów T poprzez kierowanie tych komórek na drogę apoptozy lub z powodu niezdolności makrofagów do skutecznej prezentacji antygenów **(Paziak-Domańska i wsp. 2002, Mnich i wsp. 2015)**. Ponadto *H. pylori* może unikać odpowiedzi odpornościowej gospodarza dzięki zjawisku mimikry antygenowej **(publikacje Ba5, C10)**. Dlatego poszukiwanie substancji biologicznie czynnych, które mogłyby wspierać leczenie zakażeń *H. pylori* poprzez działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne na te bakterie, lub poprzez nasilenie efektywności układu odpornościowego w walce z tymi bakteriami jest priorytetowe. Źródłem związków o działaniu immunomodulującym mogą być inne bakterie, grzyby, a także rośliny. Część z proponowanych związków nie wykazuje cech klasycznych antygenów,



lecz są mitogenami lub antygenomimetykami, które wymagają dawek przypominających, aby uzyskać skuteczne działanie **(Nair i wsp. 2019)**.

Jednym z immunomodulatorów pochodzenia grzybowego jest B-glukan (*S. cerevisiae*), który indukuje w komórkach odporności wrodzonej zmiany epigenetyczne, skorelowane z podwyższoną ekspresją genów kodujących białka zaangażowane w rozwój procesów odpornościowych **(Pelizon i wsp. 2005)**.

Komponenty roślinne o działaniu immunomodulującym mogą wzmacniać lub przeciwnie hamować odpowiedź opornościową gospodarza zarówno wrodzoną jak i nabytą **(Nair i wsp. 2019)**. Ze względu na złożony skład ekstrakty roślinne rzadziej wywołują lekooporność. Właściwości immunomodulacyjne posiadają m.in. ekstrakt *Sambucus nigra* L., który nasila produkcję cytokin takich jak IL-1 $\beta$ , IL-6 czy IL-8 oraz TNF- $\alpha$ , przez monocyty aktywowane bakteryjnym LPS. Wykazano, że ekstrakt *S. nigra* L hamuje rozwój infekcji spowodowanej wirusem grypy H1N1 poprzez blokowanie hemaglutyniny odpowiedzialnej za wnikanie wirusa do komórek gospodarza **(Młynarczyk i wsp. 2007)**. Źródłem związków biologicznie aktywnych o potencjalnym działaniu terapeutycznym mogą być gatunki z rodzaju *Salvia* z rodziny Lamiaceae ze względu na dużą zawartość flawonoidów, pochodnych kwasu fenolowego, diterpenoidów, triterpenoidów i olejków eterycznych, o szerokiej aktywności biologicznej, w tym przeciwbakteryjnej, przeciwnowotworowej i przeciwzapalnej **(Wang i wsp. 2000, Lu i Foo, 2002)**. Jednym z gatunków wytwarzających substancje o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwutleniającym jest *Salvia cadmica* Boiss., gatunek endemiczny występujący w Turcji. We wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że gatunek ten jest bogaty w polifenole. Zawiera łącznie 14 fenoli (3 flawonoidy i 11 pochodnych kwasu fenolowego), w hydrometanolowym ekstrakcie z części nadziemnych, z kwasem rozmarynowym (RA), jako głównym związkiem tej grupy. Z kolei w ekstrakcie z korzenia zidentyfikowano 10 pochodnych kwasu fenolowego, z kwasem salvianolowym K (SAK), jako głównym związkiem tej grupy **(publikacja C18)**. Duża zawartość polifenoli przełożyła się na znaczącą aktywność przeciwutleniającą ekstraktów w teście z wykorzystaniem hydratu 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) i wychwytywania O<sub>2</sub><sup>-</sup> oraz aktywność przeciwdrobnoustrojową, głównie przeciwko *Staphylococcus* spp. **(publikacja C18)**.

Przykładem immunomodulatora bakteryjnego jest preparat szczepionkowy onko-BCG - Bacillus Calmette-Guérin (Biomed, Lublin, Polska) zawierający żywe atenuowane prątki bydłęce *Mycobacterium bovis*. Preparat ten jest stosowany u ludzi do wspomagania leczenia raka pęcherza moczowego **(Hana i wsp. 2020)**. Prątki *M. bovis* BCG, po przedostaniu się do środowiska nowotworu przylegają do komórek rakowych, zostają przez nie wchłonięte i wykazują wobec nich działanie antyproliferacyjne oraz proapoptotyczne. Prątki stymulują komórki nowotworowe do produkcji

cytokin i chemokin: czynnika wzrostowego granulocytów i makrofagów - GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  oraz nasilonej ekspresji cząsteczek adhezji międzykomórkowej - ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), które są niezbędne do interakcji komórek nowotworowych z limfocytami T oraz makrofagami. Pierwszymi komórkami odpornościowymi, z którymi prątki *M. bovis* BCG mają kontakt są makrofagi i komórki dendrytyczne, które pobudzone wytwarzają cząsteczki kostymulujące niezbędne podczas prezentacji antygenów limfocytom T: cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej – MHC (*Major histocompatibility complex*) klasy II, cząsteczki B7-1 i B7-2, a także cytokiny i chemokiny IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , białko zapalne makrofagów 1 $\alpha$  - MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1-alpha*), MIP-1 $\beta$ , MIP-2 i czynnik chemotaktyczny monocytów - MCP-3 (*monocyte-chemotactic protein 3*). Komórki APC (*Antigen presenting cells*) prezentują antygeny nowotworowe limfocytom T. Cytokiny produkowane przez komórki odpornościowe, w środowisku nowotworu m.in. TNF- $\alpha$  są cytotoksyczne dla komórek nowotworowych lub stymulują ekspresję cząsteczek ICAM-1 i MHC klasy I i II. Z kolei chemokiny przyciągają oraz aktywują limfocyty T i granulocyty, które niszczą komórki nowotworowe. U pacjentów z rakiem pęcherza, otrzymujących prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG wykazano przewagę odpowiedzi limfocytów pomocniczych Th1 i Th17 oraz tłumienie odpowiedzi typu Th2. Ponadto, podczas terapii prątkami *M. bovis* BCG powstają limfocyty pamięciowe Th1, Th17 i limfocyty T cytotoksyczne Tc CD8+, co prawdopodobnie przyczynia się do zmniejszenia częstości nawrotów nowotworu po terapii. Jednak efekty te wydają się być specyficzne dla środowiska nowotworu, ponieważ w normalnych warunkach prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG nie modulują ekspresji tak wielu białek **(Alexandroff i wsp. 2010)**.

W badaniach populacyjnych nad działaniem immunomodulującym prątków szczepionkowych BCG w populacjach, w których szczepienie *M. bovis* BCG jest obowiązkowe, wykazano, że prątki BCG posiadają zdolność pobudzania wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, co skutkuje wzrostem odporności przeciwko zakażeniom wywołanym nie tylko przez prątki gruźlicy ale także przez inne drobnoustroje, co skłania do opracowania nowych terapii chorób nie związanych z gruźlicą, z wykorzystaniem szczepionki *M. bovis* BCG **(Alexandroff i wsp. 2010, Kleinnijenhuis i wsp. 2014, Töpfer i wsp. 2015)**. Zwiększona aktywność przeciwdrobnoustrojowa komórek odporności wrodzonej tj. makrofagi, nabyta wskutek tzw. „treningu odpornościowego” pod wpływem prątków *M. bovis* BCG jest wynikiem modyfikacji epigenetycznych w genach kodujących mediatory prozapalne lub metabolicznego przeprogramowania tych komórek odpornościowych przez komponenty prątków **(Rusek i wsp. 2008)**.

Jak zaznaczono powyżej, pałeczki *H. pylori* hamują aktywność fagocytarną makrofagów przez co ich rola w eliminacji tych bakterii jest ograniczona. Skłania to do poszukiwania preparatów przywracających zdolność tych komórek do fagocytozy. Szczep szczepionkowy *M. bovis* BCG jest



rozważany jako skuteczny immunomodulator makrofagów (**Masihi 2001, Yamazaki-Nakashimad i wsp. 2020**). Sugeruje się, że prątki *M. bovis* BCG mogą indukować niespecyficzną pamięć immunologiczną komórek odporności wrodzonej, która może chronić krzyżowo przed rozwojem zakażeń niehomologicznych. W kilku badaniach wykazano, że szczepienie BCG może zmniejszać śmiertelność niemowląt zakażonych *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, syncytialnym wirusem oddechowym i potencjalnie Sars-Cov-2, poprzez nasilenie wrodzonych mechanizmów odpornościowych (**Freyne i wsp. 2015, Aaby i wsp 2011, Wardhana i wsp. 2011**).

- **Perseptywa profilaktyki zakażeń *H. pylori***

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się opracowaniu szczepionki profilaktycznej i/lub leczniczej przeciwko *H. pylori*. Potrzeba taka wynika z rozpowszechnienia zakażeń *H. pylori*, ich roli w rozwoju wrzodów żołądka lub dwunastnicy oraz raka żołądka i wysokich kosztów leczenia chorób wywołanych przez te drobnoustroje. W badaniach nad opracowaniem skutecznej szczepionki, skupiono się przede wszystkim na znalezieniu najlepszej drogi jej podania, a także na opracowaniu antygenów i adiuwantów, które będą najsilniej indukowały odporność w miejscu bytowania bakterii - w błonie śluzowej żołądka. Wykazano, że antygeny *H. pylori* takie jak podjednostki ureazy - UreA i UreB, białko CagA, toksyna VacA oraz białko aktywujące neutrofile – NAP (*neutrophil-activating protein*) skutecznie pobudzają odpowiedź odpornościową i są rozpoznawane przez swoiste przeciwciała, co wskazuje, że mogłyby stanowić składniki szczepionki (**Lepper i wsp. 2004, Yan i wsp. 2005**). Na modelu myszy wykazano, że połączenie ureazy z innymi antygenami np. adhezyną - HapA (*H. pylori* adhesin A), zapewnia ochronę przed zakażeniem *H. pylori*, co było związane z wytwarzaniem przeciwciał specyficznych wobec *H. pylori* i aktywacją odpowiedzi odpornościowej gospodarza typu komórkowego z udziałem limfocytów pomocniczych Th1/Th2 (**Flach i wsp. 2011**). Innym nowatorskim rozwiązaniem jest system, w którym wirus odry jest stosowany jako wektor do ekspresji białka NapA *H. pylori*. Wykazano, że atenuowane szczepy wirusa odry wykazujące ekspresję antygeny NapA *H. pylori* indukują humoralną i komórkową odpowiedź gospodarza zarówno przeciwko antygenom wirusa odry, jak i NapA *H. pylori* (**Iankov i wsp. 2011**). Jako składniki szczepionki proponowano białka CagA, VacA i NapA w połączeniu z wodorotlenkiem glinu jako adiuwantem. Wykazano, że taki preparat szczepionkowy podany drogą iniekcji domięśniowej, wywołuje odpowiedź humoralną i komórkową gospodarza zależną od limfocytów T CD4+, swoistą wobec antygenów *H. pylori* (**Malfertheiner i wsp. 2008**). Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że niektóre antygeny *H. pylori* i warianty adiuwantów mogą indukować odporność protekcyjną, jakkolwiek wiedza na temat mechanizmów związanych z indukcją poszczepiennej odpowiedzi odpornościowej przeciwko *H. pylori* jest niewystarczająca (**Rossi i wsp. 2004, Chen i wsp. 2012**). Pomimo licznych badań poświęconych konstrukcji szczepionek profilaktycznych przeciwko *H. pylori* wciąż nie wykazano zadowalającego

efektu protekcyjnego, który jest kluczowy dla ochrony przed rozwojem zakażenia. To powoduje, że perspektywa stworzenia skutecznej szczepionki profilaktycznej lub leczniczej jest jeszcze odległa (Zeng i wsp. 2015, Tobias i wsp. 2017, Gosh i wsp. 2021, Wang i wsp. 2021).

### **Cele/zadania badawcze**

Poważne konsekwencje zakażeń wywoływanych przez pałeczki *H. pylori*, zróżnicowany ich przebieg, narastanie lekooporności izolatów klinicznych oraz mechanizmy umożliwiające unikanie tym patogenom kontroli przez układ odpornościowy gospodarza stanowią przesłankę do pogłębiania wiedzy na temat patogenezы tych zakażeń, a także podjęcia wysiłków w kierunku ulepszenia diagnostyki i sposobów leczenia. Biorąc pod uwagę powyższe, opracowanie nowych wyznaczników diagnostycznych, które będą umożliwiały śledzenie ogólnoustrojowych następstw zakażeń *H. pylori*, oraz nowych formułacji o działaniu przeciwbakteryjnym, pro-regeneracyjnym i immunomodulującym stanowi duże wyzwanie.

Problematyka badań prowadzonych przeze mnie w ramach przedłożonego do oceny osiągnięcia naukowego koncentruje się wokół możliwości śledzenia ogólnoustrojowych konsekwencji zakażenia *H. pylori* z zastosowaniem widm spektroskopowych w podczernieni, w transformacji Fouriera, a także wokół oceny przydatności ekstraktów z *Salvia cadmica* do ochrony komórek nabłonkowych żołądka przed uszkodzeniem tej bariery przez pałeczki *H. pylori* i ich komponenty oraz rozwojem patologicznej reakcji zapalnej. Efekty te mogą być osiągnięte poprzez inicjowanie przez ekstrakty procesów naprawczych i nasilanie mechanizmów odpornościowych, w szczególności przywracania aktywności makrofagów utraconej w środowisku komponentów *H. pylori*. W tym kontekście moje zainteresowania badawcze koncentrują się również na ocenie immunomodulacyjnych właściwości prątków szczepionkowych *Mycobacterium bovis* BCG, w kierunku wzmagania fagocytozy *H. pylori* przez makrofagi. Powyższe kierunki badawcze nie były do tej pory realizowane w odniesieniu do zakażeń *H. pylori*.

Powższe cele realizowano w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. Badania *in vitro* przeprowadzono na modelach komórkowych: pierwotnych komórkach nabłonkowych żołądka oraz fibroblastach kawii domowej, a także monocytach/makrofagach człowieka, linii THP-1; w badaniach *in vitro* wykorzystano również materiał biologiczny (surowice) pochodzące od pacjentów z potwierdzonym zakażeniem *H. pylori*: dzieci z zaburzeniami wzrostu (niedowzrostem) oraz pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i odpowiednio surowice dziedziny zdrowych oraz zdrowych osób dorosłych. Badania *in vivo* prowadzono na modelu doświadczalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowej. Na badania z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów i osób zdrowych, a także na badania na modelu zwierzęcym kawii domowej uzyskano wymagane ustawowo zezwolenia komisji

etycznych, odpowiednio RNN/134/13/KE/2-13; 34/KBBN-UŁ/I/201; 10/KBBN-UŁ/II/2015 (badania z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od ludzi) oraz 58/ŁB45/2016 (badania na modelu zwierzęcym kawy domowej).

#### **Badania realizowano w trzech blokach tematycznych:**

#### **I. Ocena przydatności widm spektroskopii w podczerwieni w transformacji Fouriera (FTIR) do śledzenia zmian ogólnoustrojowych podczas zakażenia *Helicobacter pylori* na podstawie:**

- analizy widm IR surowicy kawy domowych niezakażonych w porównaniu do widm surowic zwierząt eksperymentalnie zakażonych *H. pylori*, w połączeniu z hierarchiczną analizą skupień; **[publikacja A1];**
- analizy widm IR surowic dzieci z wykluczonym zakażeniem *H. pylori* w porównaniu do widm surowic dzieci z niedowzrostem, z potwierdzonym zakażeniem *H. pylori*, w połączeniu ze sztuczną siecią neuronową; **[publikacja A2];**
- analizy widm IR surowic pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (ChNS) zakażonych *H. pylori*, w odniesieniu do widm surowic osób zdrowych, niezakażonych *H. pylori* lub z bezobjawowym zakażeniem tymi bakteriami, w połączeniu ze sztuczną siecią neuronową; **[publikacja A1].**

#### **II. Ocena efektywności ekstraktów *Salvia cadmica* (z pędów/liści lub korzeni) w ochronie komórek bariery nabłonkowej żołądka oraz makrofagów przed szkodliwym działaniem pałeczek *H. pylori* i ich komponentów, na podstawie:**

- aktywności bakteriobójczej
- zapobiegania dezintegracji komórek bariery nabłonkowej żołądka;
- modulowania komórkowych procesów naprawczych **[publikacja A4];**
- pobudzania aktywności makrofagów **[publikacja A5].**

#### **III. Charakterystyka prątków szczepionkowych *M. bovis* BCG w kierunku nasilania aktywności fagocytarnej monocytów/makrofagów hamowanej w środowisku żywych pałeczek *H. pylori* **[publikacja A6].****

Przesłanką do podjęcia tych badań jest wysoka częstość zakażeń *H. pylori* – w Polsce odsetek zakażeń wynosi ok. 74%, na świecie średnio ok. 50%, z czego 20% to zakażenia objawowe, oraz poważne konsekwencje przewlekłych zakażeń *H. pylori* u ludzi związane z miejscem bytowania tych bakterii tj. przewlekłe zapalenie nabłonka żołądka, wrzody żołądka, wrzody dwunastnicy, a nawet rak żołądka. Wzięto pod uwagę również ogólnoustrojowe konsekwencje zakażeń *H. pylori* t.j. niedowzrost u dzieci oraz choroba niedokrwienna serca (ChNS), u osób dorosłych. Reakcja zapalna w nabłonku żołądka może występować również u osób zakażonych bezobjawowo. Na zróżnicowany przebieg zakażeń

*H. pylori* wpływ mają czynniki osobnicze gospodarza, wirulencja bakterii, a także czynniki socjalno-ekonomiczne. Nadmierne zapalenie błony śluzowej żołądka lub dwunastnicy inicjowane przez *H. pylori* powoduje uszkodzenie nabłonka tych narządów, co może skutkować rozwojem ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Jeśli infekcja nie jest leczona dwoma lub więcej antybiotykami jednocześnie, staje się przewlekła. Wynika to z unikania przez *H. pylori* mechanizmów obronnych gospodarza i rosnącej antybiotykoodporności tych bakterii. W 2018 roku Światowa Organizacja Zdrowia – WHO (*World Health Organization*) uznała, że oporność *H. pylori* na antybiotyki osiągnęła alarmujący poziom, a zakażenia spowodowane przez izolaty klarytromycynooporne za wymagające zastosowania nowych substancji leczniczych. **Wysoka częstość zakażeń *H. pylori* oraz poważne ich konsekwencje skłaniają do poszukiwania szybkich metod śledzenia zmian ogólnoustrojowych będących następstwem takich zakażeń. Natomiast rosnąca oporność pałeczek *H. pylori* na antybiotyki skłania do poszukiwania nowych, alternatywnych dla antybiotyków, preparatów, które mogłyby być stosowane do leczenia lub wspomagania leczenia zakażeń *H. pylori*. Potencjalnymi kandydatami są formułacje zawierające drobnoustroje lub ich komponenty oraz związki roślinne o działaniu bakteriobójczym, pro-regeneracyjnym, a także immunomodulującym, których działanie polega na wzmacnianiu mechanizmów odpornościowych gospodarza. W zakażeniu *H. pylori* takie podejście wydaje się uzasadnione, ponieważ bakterie te powodują destabilizację komórek bariery nabłonkowej żołądka, a także osłabiają aktywność komórek odpornościowych gospodarza.**

Upřednio wykazaliśmy, że *H. pylori*, a także komponenty tych bakterii, takie jak LPS niszczą barierę nabłonkową żołądka w wyniku nasilenia stresu oksydacyjnego i apoptozy komórek (**publikacja Ba2, C14, Grębowska i wsp. 2008**). Zmniejszają aktywność komórek odpornościowych, w tym makrofagów, komórek NK i limfocytów T (**Chmiela i wsp. 1997, Allen 2007, Paziak-Domańska i wsp. 2002, Rudnicka i wsp. 2015**). Takie działanie na komórki odpornościowe może skutkować utrzymywaniem się infekcji i rozwojem reakcji patologicznych w błonie śluzowej żołądka, z możliwością wystąpienia takich skutków na obwodzie. Wykazaliśmy, że komponenty *H. pylori* uszkodzają komórki śródbłonka naczyniowego, które wspierają układ odpornościowy dostarczając cytokiny i komórkowe czynniki wzrostowe (**publikacja C9**). Zatem, potencjalnie mogą przyczyniać się do rozwoju chorób naczyniowych m.in. choroby niedokrwiennej serca (**publikacja C9**). Podczas zakażenia *H. pylori* u niektórych dzieci odnotowano wytwarzanie przeciwciał przeciwko hormonom regulującym apetyt. Zatem bakterie te mogą również przyczyniać się do zaburzeń metabolicznych i ogólnorozwojowych u dzieci (**Czkwianianc i wsp. 2017, Stawerska i wsp. 2015; 2015a**).

## OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

**CEL I: Ocena przydatności widm spektroskopii w podczerwieni w transformacji Fouriera (FTIR) do śledzenia zmian ogólnoustrojowych podczas zakażenia *Helicobacter pylori* na podstawie:**

- a) analizy widm IR surowic kawii domowych niezakażonych lub eksperymentalnie zakażonych *H. pylori*, w połączeniu z hierarchiczną analizą skupień; [publikacja A1]; celem badania było wyznaczenie sygnatur do potwierdzenia doświadczalnego zakażenia *H. pylori* z towarzyszącą reakcją zapalną na modelu wolnym od naturalnego zakażenia tymi bakteriami;
- b) analizy widm IR surowic dzieci niezakażonych *H. pylori* (43) lub widm surowic dzieci zakażonych *H. pylori* z objawami dyspepsji (41), w tym 36 surowic od dzieci z niedowzrostem, w połączeniu ze sztuczną siecią neuronową; [publikacja A2]; celem badania było poszukiwanie wyznaczników potwierdzających zakażenie *H. pylori* i jego powiązanie z zaburzeniami wzrostu u dzieci;
- c) analizy widm IR surowic pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (ChNS) eksponowanych na zakażenie *H. pylori* (90), w odniesieniu do widm surowic osób zdrowych *H. pylori* seropozytywnych (21) lub *H. pylori* seronegatywnych (32), w połączeniu ze sztuczną siecią neuronową; celem badania było wyznaczenie sygnatur umożliwiających diagnozowanie pacjentów z ChNs, z towarzyszącym zakażeniem *H. pylori*, w odniesieniu do pacjentów zdrowych bez objawów choroby niedokrwiennej serca, eksponowanych na pałeczki *H. pylori* [publikacja A3];

**A1. Gonciarz W.,** Lechowicz Ł., Urbaniak M., Kaca W., Chmiela M. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) for monitoring experimental *Helicobacter pylori* infection and related inflammatory response in guinea pig model. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22, 281. [DOI: org/10.3390/ijms22010281]. [IF<sub>5-letni</sub> = **6,132**; MEiN = **140**].

**A2. Gonciarz W.,** Lechowicz Ł., Urbaniak M., Rechcinski T., Chalubiński M., Broncel M., Kaca W., Chmiela M. Searching for serum biomarkers linking coronary heart disease and *Helicobacter pylori* infection using infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Scientific Reports*. **2022**, 12, 18284/ [DOI:10.1038/s41598-022-23191-z]. [IF<sub>5-letni</sub> = **5,516**; MEiN = **140**].

**A3. Gonciarz W.,** Lechowicz Ł., Urbaniak M., Kaca W., Chmiela M. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Artificial Neural Networks Applied to Investigate Quantitative Changes of Selected Soluble Biomarkers, Correlated with *H. pylori* Infection in Children

and Presumable Consequent Delayed Growth. *Journal of Clinical Medicine*. 2020, 9, 3852. [DOI:10.3390/jcm9123852]. [IF<sub>5-letni</sub> = 4,566; MEIN= 140].

Bakterie *H. pylori* indukują komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną gospodarza. Przewlekły charakter zakażeń *H. pylori* sugeruje, że układ odpornościowy nie jest w stanie wyeliminować tych bakterii (**Chmiela i Michetti, 2006**). Wiedza na temat patogenezy i zróżnicowanego przebiegu zakażeń *H. pylori* jest niewystarczająca. Dlatego, modele zwierzęce, które umożliwiają śledzenie naturalnej historii zakażenia *H. pylori*, związanego z nim stanu zapalnego i pobudzanych procesów odpornościowych są bardzo przydatne w śledzeniu przebiegu zakażenia. W badaniach nad patogenezą zakażeń *H. pylori* wykorzystywane są: myszy, myszokoczki mongolskie, świnki morskie (*Cavia porcellus*), psy, koty, świnie i małpy (**Peek, 2008**). Kawie domowe (świnki morskie) są uważane za optymalny model, z uwagi na podobieństwo z człowiekiem pod względem: budowy i fizjologii żołądka, odpowiedzi odpornościowej wrodzonej, w tym białek dopełniacza, odpowiedzi adaptacyjnej swoistej z udziałem limfocytów B oraz limfocytów T, fizjologii grasicy, szpiku kostnego, płuc oraz odpowiedzi kortykosteroidowej (**Bitter-Suermann i wsp. 1981**). Świnki morskie nie są naturalnym rezerwuarem *Helicobacter* spp., są jednak podatne na zakażenie *H. pylori*, które można potwierdzić przez badanie histopatologiczne wycinków tkanki żołądka pod kątem odpowiedzi zapalnej, obecności organizmów *Helicobacter*-podobnych (HLO), a także poprzez wykrycie określonych sekwencji nukleotydowych m.in. kodującej wysoce specyficzne białko *H. pylori* związane z cytotoxyną – CagA (*Cytotoxin associated gene A antygen*) przy użyciu metod molekularnych tj. reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). Pomocnicze jest także badanie serologiczne próbek surowicy celem wykrycia swoistych przeciwciał anti-*H. pylori* lub badanie próbek kału na obecność antygenów *H. pylori* (**Whary i Fox, 2004**).

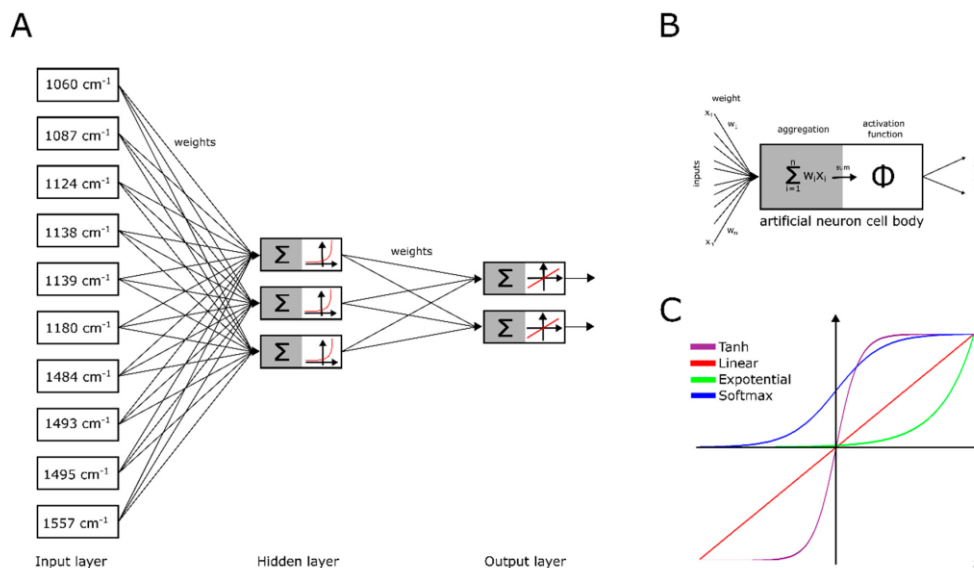
Zróżnicowany przebieg zakażeń *H. pylori* oraz brak testów diagnostycznych, które umożliwiałyby śledzenie dynamiki przebiegu takich zakażeń na podstawie wyznaczników obwodowych stanowią przesłankę do poszukiwania nowych/alternatywnych metod diagnostycznych do jakościowego i ilościowego oznaczania rozpuszczalnych markerów, które byłyby pomocne w monitorowaniu przebiegu infekcji i jej skutków. W ostatnim czasie zaczęto wykorzystywać szybkie metody fizyko-chemiczne, takie jak spektroskopia w podczerwieni, w transformacji Fouriera (FTIR) do diagnozowania chorób i badania komórek makroorganizmu na podstawie zmian opartych na analizie spektralnej płynów biologicznych, takich jak krew, surowica, ślina i mocz (**Zhou i wsp. 2007**).

Widma FTIR próbek biologicznych można podzielić na grupy składników za pomocą typowych pasm absorpcji w oknach liczby falowej (W): W1 — kwasy tłuszczowe (liczba falowa zakres od 3000 cm<sup>-1</sup> do 2800 cm<sup>-1</sup>), W2 – peptydy i białka (zakres liczby falowej 1800 cm<sup>-1</sup> do 1500 cm<sup>-1</sup>), W3 — białka, związki przenoszące fosforany i kwasy tłuszczowe (zakres liczby falowej od 1500 cm<sup>-1</sup> do 1200 cm<sup>-1</sup>),

W4 — węglowodany (zakres liczby falowej od 1200  $\text{cm}^{-1}$  do 900  $\text{cm}^{-1}$ ). Okno W5 (zakres liczby falowej od 900  $\text{cm}^{-1}$  do 750  $\text{cm}^{-1}$ ) odpowiada unikatowym pikom dla próbek biologicznych **(Naumann i wsp. 1991, 2000; Cooper i Knutson, 1995)**. Taki podział zastosowałam w badaniach wykonanych z wykorzystaniem następujących surowic: kawii domowych niezakażonych lub zakażonych *H. pylori*, dzieci z wykluczonym zakażeniem *H. pylori* lub dzieci z objawami dyspepsji, z potwierdzonym zakażeniem *H. pylori*, w tym dzieci z niedowzrostem, a także pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (ChNS) zakażonych *H. pylori*, lub osób zdrowych bez objawów tej choroby, eksponowanych na zakażenie *H. pylori* lub z wykluczonym zakażeniem **[publikacje A1-A3]**.

Zidentyfikowałam unikatowe fragmenty widm IR dla poszczególnych próbek surowic badanych, za pomocą testu statystycznego chi-kwadrat, na podstawie których zaprojektowane zostały predykcyjne modele matematyczne celem różnicowania badanych próbek. Użyłam hierarchicznej analizy skupień (HCA) (dla mniej licznych grup badanych), **[publikacja A1]**, która polega na budowaniu hierarchii skupień, celem ułożenia badanych obiektów w grupy w taki sposób, aby stopień powiązania obiektów z obiektami należącymi do tej samej grupy był jak największy, a z obiektami z pozostałych grup jak najmniejszy. Dla liczniejszych grup badanych zastosowałam sztuczną sieć neuronową ANN (*artificial neuronal network*) **[publikacje A2, A3]**, która jest stosowana min. do analizy danych chemometrycznych (np. w ocenie wrażliwości bakterii na antybiotyki lub identyfikacji czynników zakaźnych), i polega na „uczeniu” ANN, czyli przedstawieniu ANN wraz z zawartymi w niej danymi w zbiorze uczącym, a następnie obliczeniu błędów popełnianych przez sieć **(Lechowicz i wsp. 2012, 2013; Żarnowiec i wsp. 2015)**. Przykładowy schemat „uczenia” ANN i jej tworzenia przedstawiono na Rycinie 1 **[publikacja A2 i A3]**. Ponadto, każde otrzymane widmo IR badanych surowic analizowałam pod względem pasma drgań poprzez porównanie położenia względem intensywności i kształtów prążków, w powiązaniu z „unikatowymi” biomolekułami **[publikacja A2 i A3]**.





**Rycina 1.** Topologia sztucznej sieci neuronowej oparta na najlepszej sieci do wykrywania zakażenia *Helicobacter pylori*. (A) Topologia sztucznej sieci neuronowej. (B) Szczegółowa budowa sztucznego neuronu. (C) Najczęstsze funkcje aktywacyjne sztucznego neuronu, [publikacja A2].

Layer- warstwa wejściowa; weight- waga; hidden layer-ukryta warstwa; output layer-warstwa wyjściowa; tanh-tangens; linear- liniowa; exponential-wykładnicza; softmax- znormalizowana funkcja wykładnicza; agregation -agregacja; artificial neuron cell body – „ciało” komórki sztucznego neuronu.

Z uwagi na powyższe pierwszym celem osiągnięcia naukowego [publikacja A1, A2 i A3] było:

- Określenie unikatowych liczb falowych dla widm IR surowic kawii domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori* pod kątem produkcji przeciwciał oraz biomarkerów zapalnych i metabolicznych związanych z zakażeniem, a także zaprojektowanie predykcyjnego modelu matematycznego opartego na unikatowych liczbach falowych widm IR w metodzie hierarchicznej analizy skupień, do różnicowania zwierząt zakażonych *H. pylori* i niezakażonych [publikacja A1];
- Określenie unikatowych motywów widm IR dla surowic dzieci zakażonych *H. pylori* w odniesieniu do surowic dzieci niezakażonych, ułatwiających śledzenie zmian obwodowych skorelowanych z tym zakażeniem, które mogą skutkować niedowzrostem oraz zaprojektowanie predykcyjnego modelu matematycznego opartego na wyselekcjonowanych unikatowych motywach widm IR z wykorzystaniem metody sztucznej sieci neuronowej, do różnicowania dzieci zakażonych *H. pylori* i niezakażonych [publikacja A2];
- Określenie unikatowych fragmentów widm IR dla ludzkich surowic pochodzących od zdrowych dawców, niezakażonych lub eksponowanych na *H. pylori* oraz od pacjentów z ChNS zakażonych tymi bakteriami. Celem badania była identyfikacja markerów biologicznych związanych ze stanem zapalnym indukowanym podczas zakażenia *H. pylori* oraz markerów



charakterystycznych dla ChNS, a także zaprojektowanie predykcyjnego modelu matematycznego opartego na wyselekcjonowanych unikatowych motywach widm IR z wykorzystaniem metody sztucznej sieci neuronowej, do identyfikacji dorosłych pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* [publikacja A3];

**Cel I. a)** Cel ten zrealizowano na modelu *in vivo*, w którym użyto kawie domowe eksperymentalnie zakażone drogą pokarmową pałeczkami *H. pylori* oraz zwierzęta niezakażone. U wszystkich zwierząt otrzymujących *H. pylori* potwierdziłam zakażenie po 28 dniach od podania ostatniej dawki tych bakterii z wykorzystaniem metod histologicznych, molekularnych i serologicznych, wg wcześniej opisanej procedury (publikacja Ba2, Bb5). Oceeniłam także poziom białka C-reaktywnego (CRP) oraz czynnika martwicy guzów (TNF- $\alpha$ ), które są kluczowymi ogólnoustrojowymi markerami stanu zapalnego. Eksperymenty *in vivo* zostały opracowane zgodnie z dyrektywą UE (Dyrektywa 2010/63/ UE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33–79) i zostały zatwierdzone uchwałą Lokalnej Komisji Etycznej (LKE9) ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, która została powołana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce (decyzja numer 58/ŁB45/2016), [publikacja A1].

W analizie uwzględniłam pasma absorpcji białek, lipidów i węglowodanów. Zidentyfikowałam następujące cząsteczki w widmach IR surowic kawii: glukozę, przeciwciała klasy IgM i IgG, transferynę, białko CRP oraz TNF- $\alpha$ , które umożliwiły rozróżnienie grup badanych: zwierzęta zakażone *H. pylori* od niezakażonych. Następnie przypisałam wyżej wymienionym cząsteczkom pasma absorpcji i odpowiadające im drganie i wiązanie chemicznie oraz określiłam liczby falowe korelujące z zakażeniem *H. pylori*, a na ich podstawie opracowałam modele matematyczne identyfikujące surowice zakażonych zwierząt.

Analiza HCA regionów W2 – W4, dla 10 najsilniej korelujących z zakażeniem *H. pylori* liczb falowych widm IR wykazała dwa odrębne klastry. **Klaster I** odpowiada zwierzętom niezakażonym, podczas gdy **klaster II** jest reprezentatywny dla zwierząt zakażonych *H. pylori*. Piki w obszarze widma W2-W4 dla zwierząt zakażonych *H. pylori* mogą odzwierciedlać wytwarzanie przeciwciał i/lub zwiększoną produkcję białek zapalnych.

Wykazanie przeze mnie przydatności metody FTIR, w połączeniu z algorytmem matematycznym, do różnicowania zwierząt zakażonych *H. pylori* i niezakażonych tymi bakteriami, skłoniło mnie do sprawdzenia w kolejnej pracy [publikacja 2], czy powyższą metodę można zastosować do analizy surowic pacjentów zakażonych *H. pylori* z określonymi ogólnoustrojowymi konsekwencjami tego zakażenia. Mając na uwadze zaburzenia wzrostu u dzieci zakażonych tymi bakteriami moim celem było

sprawdzenie czy dla surowic dzieci zakażonych lub niezakażonych *H. pylori* będą mogła opracować model matematyczny, celem odróżnienia badanych grup [Cel I.b].

**Cel I. b)** Cel ten realizowano z wykorzystaniem surowic dzieci zdrowych, które stanowiły grupę kontrolną (43 osoby obojga płci, średnia wieku  $11,5 \pm 2,8$ ), oraz surowic dzieci z zapaleniem błony śluzowej żołądka wywołanym przez *H. pylori* (41 osób obojga płci, średnia wieku  $12,5 \pm 3,3$ ), które znajdowały się pod opieką ICZMP-RI w Łodzi. W tej grupie 36 pacjentów wykazywało cechy niedowzrostu.

**Biorąc pod uwagę liczne badania, w tym własne, wskazujące na możliwy udział zakażenia *H. pylori* w rozwoju lub nasilaniu objawów choroby niedokrwiennej serca (ChNS) moim celem było opracowanie modelu matematycznego na podstawie widm IR w podłączeniu z ANN różnicującego surowice pacjentów dorosłych z ChNS zakażonych *H. pylori* od surowic osób dorosłych bez objawów ChNS eksponowanych na pałeczki *H. pylori* lub bez takiej ekspozycji. Zatem czy u pacjentów zakażonych można wykazać sygnatury korelujące z ChNS. [Cel I.c], [publikacja A3].**

**Cel I. c)** Cel ten realizowano z wykorzystaniem surowic pacjentów z ChNS, zakażonych *H. pylori* (90), osób zdrowych bez objawów CHNs: z bezobjawowym zakażeniem *H. pylori* (21) lub niezakażonych (32) [publikacja A3], które znajdowały się pod opieką II Kliniki Kardiologii Szpitala Wojewódzkiego im. Biegańskiego (Uniwersytet Medyczny w Łodzi) lub Kliniki Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej (Uniwersytet Medyczny w Łodzi).

Zakażenie *H. pylori* u wszystkich pacjentów i zdrowych dawców oceniano za pomocą ureazowego testu oddechowego ( $^{13}\text{C}$  UBT), wg wcześniej opisaney metody (Bielański i Konturek 1996), immunoblottingu do oceny przeciwciał IgG anty-*H. pylori* oraz testu immunoenzymatycznego ELISA, wg wcześniej opisanych procedur (Rechciński i wsp. 1997). Ponadto dzieci  $^{13}\text{C}$  UBT-dodatnie z objawami dyspepsji zostały poddane gastrokopii, podczas której pobrano wycinki tkanki żołądka do rutynowego badania histopatologicznego, w kierunku identyfikacji organizmów *Helicobacter* podobnych – HLO (*Helicobacter*-like organisms) i odpowiedzi zapalnej wg. „Systemu Sydney”. Niedowzrost u dzieci oceniano zgodnie ze standardami populacyjnymi (Palczewska i Niedzwiecka 2001). Diagnostyka ChNS u dorosłych pacjentów została wykonana w ramach współpracy z klinicystami na podstawie badania koronarograficznego oraz oznaczeń fizjologicznych, a także biochemicznych uwzględniających klasyczne czynniki ryzyka ChNS, w tym pomiary/oznaczenia: ciśnienia tętniczego, glukozy, hemoglobiny glikolizowanej, dyslipidemii, hiperlipidemii (cholesterol całkowity, frakcja lipidowa o niskiej gęstości – LDL, frakcja lipidowa o wysokiej gęstości – HDL, triglicerydy), indeksu masy ciała. W wywiadzie uwzględniono również nikotynizm.

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Instytucie Badawczym – Centrum Zdrowia Matki Polki (PMMH-RI) w Łodzi (RNN/134/13/KE/2-13) oraz Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (protokół: 34/KBBN-UŁ/I/201 i 10/KBBN-UŁ/II/2015). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono zgodnie z zatwierdzonymi w/w wytycznymi. Uzyskano świadomą zgodę pacjentów lub ich opiekunów na eksperymenty, z uwzględnieniem ustawowej ochrony danych osobowych uczestników badania.

W otrzymanych widmach IR surowic dzieci, zidentyfikowałam unikatowe biocząsteczki:  $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -karoten, kwas foliowy, grelinę, leptynę, likopen, luteinę, witaminę B6, witaminę B12 i witaminę C, które pozwoliły na różnicowanie między dziećmi zakażonymi i niezakażonymi *H. pylori* na podstawie 10 liczb falowych (W4-6 liczb falowych, W3-3 liczny falowe; W2- 1 liczba falowa), które mogą odpowiadać wytwarzaniu w/w biocząsteczek. Dla porównania w widmach IR dla wszystkich badanych surowic dorosłych pacjentów zaobserwowałam znaczne różnice w pasmach absorpcji lipidów, białek, a także węglowodanów. Wykazałam różnice w widmach absorpcji dla wybranych biocząsteczek skorelowanych z zakażeniem *H. pylori* jak i ChNS: triglicerydów, białka CRP, homocysteiny, lipoprotein LDL oraz TNF- $\alpha$ . Następnie określiłam liczby falowe w widmach IR korelujące tylko z zakażeniem *H. pylori* (W3, 5 predyktorów), celem różnicowania surowic osób zakażonych od osób zdrowych niezakażonych oraz liczby falowe, które różnicują surowice pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* od surowic osób zdrowych (W3, trzy predyktory, W2 jeden predyktor).

Następnie dla najlepszych wytypowanych predyktorów (w obrębie grup badanych dzieci lub dorosłych) zaproponowałam modele matematyczne - ANN. Najlepsza ANN różnicująca dzieci zakażone *H. pylori* od niezakażonych zawierała 10 neuronów wejściowych, 3 neurony ukryte i 2 neurony wyjściowe, podczas gdy dla osób dorosłych w obrębie takich samych grup zawierała 5 neuronów wejściowych i 5 neuronów ukrytych i 2 neurony wyjściowe, a wartość diagnostycznego ilorazu szans (DOR) wynosiła 598, co oznacza, że sieć neuronowa prawidłowo rozróżnia próbki surowicy. Natomiast najlepsza ANN różnicująca pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* od osób zdrowych zawierała 4 neurony wejściowe i 2 neurony ukryte i 2 neurony wyjściowe, a otrzymana wartość DOR wynosiła 597, co świadczy o tym, że sieć neuronowa prawidłowo rozróżnia badane próbki surowicy. Czułość i swoistość opracowanego testu diagnostycznego na podstawie widm IR przedstawiono w Tabeli 3.

**Tabela 3** Czulość i swoistość opracowanego testu diagnostycznego opartego na analizie widm IR.

Badane surowice	Czulość	Swoistość
Zwierzęta zakażone <i>H. pylori</i> vs zwierzęta niezakażone	97%	100%
Dzieci zakażone <i>H. pylori</i> vs dzieci zdrowe	95%	86%
Osoby dorosłe zakażone <i>H. pylori</i> vs osoby niezakażone	98%	92%
Osoby dorosłe zakażone <i>H. pylori</i> z CHNS vs osoby zdrowe	97%	91%

Podsumowując, w przedstawionych badaniach opracowano prognostyczny model matematyczny: algorytm k-NN do różnicowania kawii domowych zakażonych *H. pylori* od zwierząt niezakażonych tymi bakteriami, na podstawie markerów zapalenia, z czulością 97% i swoistością 100%.

Do zaprojektowania ANN dla surowic dzieci wybrano 10 liczb falowych widm IR korelujących z zakażeniem *H. pylori*. Czulość i swoistość testu w tym modelu wynosiły, odpowiednio 95% i 86%, a dokładność sięgała 90%. Badanie to pokazuje, że połączenie spektroskopii w podczerwieni i techniki ANN może być przydatne do różnicowania próbek surowicy pochodzących od dzieci zakażonych lub niezakażonych *H. pylori*. W szczególności wyselekcjonowane do analizy komponenty: witamina A, witamina B6, witamina B12, witamina C, tokoferol, kwas foliowy, karoten i luteina, a także peptydy hormonalne grelina i leptyna, mogą być pomocne w diagnozowaniu dzieci z niedowzrostem o etiologii zakażenia *H. pylori*.

Wyniki uzyskane z surowicami osób dorosłych wskazują, że spektroskopia IR w połączeniu z ANN może być pomocnym narzędziem w monitorowaniu pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori*, na podstawie markerów zapalenia oraz frakcji lipidów. W tym modelu czulość i swoistość testu wynosiły, odpowiednio 97% i 91%. Na niższą swoistość ANN w przypadku surowic pochodzących od ludzi, w odróżnieniu od surowic kawii domowych, mogły wpłynąć inne infekcje lub reakcje o podłożu zapalnym, nie diagnozowane w trakcie tych badań.

Uzyskane wyniki wskazują, że w przyszłości wysoce selektywne modele matematyczne mogą być pomocne w opracowaniu narzędzia do szybkiego wykrywania zakażenia *H. pylori* oraz śledzenia kinetyki zmian obwodowych, będących następstwem zakażenia. Identyfikacja charakterystycznego profilu surowicy pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* może być przydatna we wczesnej diagnostyce stanowiącej przesłankę do eradykacji *H. pylori*, jako patogenu powiązanego z rozwojem choroby niedokrwiennej serca na co wskazują liczne badania. Natomiast identyfikacja charakterystycznego profilu surowicy dzieci zakażonych *H. pylori* może być pomocna we wczesnym diagnozowaniu możliwych następstw zakażenia i podejmowaniu adekwatnych procedur leczniczych.

**Za najważniejsze wnioski wynikające z tej części badań uważam:**

1. Wykazanie przydatności metody FTIR, w połączeniu z algorytmem matematycznym – hierarchiczną analizą skupień, do różnicowania kawii domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori* od niezakażonych, na podstawie zidentyfikowanych unikatowych pasm absorpcji w widmach IR, odpowiadających markerom zapalenia: immunoglobuliny, białko CRP, TNF- $\alpha$ . Czulość metody oszacowano na 97% zaś swoistość na 100%.
2. Wykazanie przydatności metody FTIR na podstawie unikatowych liczb falowych odpowiadających wyselekcjonowanym biocząsteczkom (witamina A, witamina B6, witamina B12, witamina C,  $\alpha$ -tokoferol, kwas foliowy, karoten i luteina, a także peptydy hormonalne grelina i leptyna), w połączeniu z algorytmem matematycznym – sztuczną siecią neuronową (ANN), do rozróżnienia próbek surowic dzieci z potwierdzonym lub wykluczonym zakażeniem *H. pylori* z czulością 95%, swoistością 86% i dokładnością 90%.
3. Potwierdzenie przydatności metody FTIR w połączeniu z algorytmem matematycznym – sztuczną siecią neuronową do:
  - różnicowania dorosłych pacjentów zakażonych *H. pylori* od niezakażonych na podstawie zidentyfikowanych unikatowych pasm absorpcji odpowiadających triglicerydom w widmach IR o czulości 98%, swoistości 92% i dokładności 96%.
  - różnicowania dorosłych pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori* od niezakażonych na podstawie unikatowych pasm absorpcji odpowiadających białku CRP i triglicerydom w widmach IR, o czulości 97%, swoistości 91%.

Przewlekłe zakażenie *H. pylori* indukuje patologiczną reakcję zapalną zarówno lokalnie, jak i na obwodzie, prawdopodobnie w wyniku przedostawania się bakteryjnych komponentów do krążenia, co zwiększa ryzyko rozwoju chorób ogólnoustrojowych. W badaniach własnych Zespołu KLiBI wykazaliśmy, że procesy patologiczne w zakażeniu *H. pylori* są związane m.in. z nadmiernym stresem oksydacyjnym, nasileniem apoptozy i hamowaniem regeneracji nabłonka przez te bakterie i ich komponenty (**publikacja Ba2, Ba3, C12**). Ponadto pałeczki *H. pylori* są trudne do eradykacji ponieważ hamują mechanizmy odpornościowe (**Chmiela i wsp. 1997, Allen 2007, Paziak-Domańska i wsp. 2002, Rudnicka i wsp. 2015**) i cechują się wysoką lekoopornością na powszechnie stosowane antybiotyki (**Savoldi i wsp. 2018**), co zgodnie z rekomendacją WHO stanowi przeszkodę do poszukiwania nowych preparatów do leczenia zakażeń *H. pylori*, niwelowania ich skutków i nasilania procesów odpornościowych. W związku z powyższym celem II i III części badań była ocena wyselekcjonowanych biokomponentów w kierunku ich działania bakteriobójczego lub bakteriostatycznego wobec *H. pylori*

oraz działania pro-regeneracyjnego wobec komórek nabłonkowych żołądka i immunomodulacyjnego wobec makrofagów: [publikacja A4, A5 i A6]:

## II. Ocena przydatności ekstraktów *Salvia cadmica* (z pędów/liści lub korzeni) do zapobiegania niekorzystnym skutkom oddziaływania pałeczek *H. pylori* na komórki bariery nabłonkowej żołądka oraz komórki immunokompetentne – makrofagi, na podstawie:

- a) aktywności bakteriobójczej wobec referencyjnych szczepów *H. pylori* oraz szczepów klinicznych opornych na klarytromycę/metronidazol;
- b) zapobiegania destabilizacji bariery nabłonkowej żołądka poprzez hamowanie stresu oksydacyjnego i apoptozy, indukowanych przez rozpuszczalne komponenty *H. pylori* oraz modulowania procesów naprawczych poprzez wpływ na wydzielanie pro-regeneracyjnej IL-33 [publikacja A4];
- c) pobudzania aktywności fagocytarnej makrofagów osłabionej w środowisku LPS *H. pylori*, modulowania polaryzacji makrofagów M1/M2, modulowania ścieżki sygnałowej NF-kappa B oraz wytwarzania cytokin, a także hamowania nadmiernego stresu oksydacyjnego [publikacja A5];

**A4 Gonciarz W.**, Piątczak E., Płoszaj P., Gościński G., Chmiela M. *Salvia cadmica* extracts rich in polyphenols neutralize a deleterious effects of oxidative stress driven by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in cell cultures of gastric epithelial cells or fibroblasts. *Industrial Crops and Products*. **2022**, 178, 114633. [DOI:10.1016/j.indcrop.2022.114633]. [IF<sub>5-letni</sub> = **5,645**; MEiN= **200**].

**A5 Gonciarz W.**, Piątczak E., Chmiela M. The influence of *Salvia cadmica* Boiss. extracts on the M1/M2 polarization of macrophages primed with *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in conjunction with NF-kappa B activation, production of cytokines, phagocytic activity and total DNA methylation. *Journal of Ethnopharmacology*. **2023**, 310, 116386. [DOI.org/10.1016/j.jep.2023.116386]. [IF<sub>5-letni</sub> = **5,195**; MNISW= **140**].

## III. Ocena przydatności prątków szczepionkowych *M. bovis* BCG do pobudzenia aktywności fagocytarnej monocytów/makrofagów hamowanej w środowisku żywych pałeczek *H. pylori* na podstawie [publikacja A6]:

- a) nasilenia aktywności fagocytarnej monocytów/makrofagów osłabionej w środowisku żywych pałeczek *H. pylori*, modulowania polaryzacji M1/M2 makrofagów oraz ścieżki sygnałowej NF-kappa B wraz z oceną wytwarzania cytokin pro-lub przeciwzapalnych, a także całkowitej metylacji metylacji DNA, jako wskaźnika modyfikacji epigenetycznych [publikacja A6];

**A6 Gonciarz W., Chyb M., Chmiela M.** *Mycobacterium bovis* BCG increase the selected determinants of monocyte/macrophage activity, which were diminished in response to gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*. **2023**, 13, 3107. [DOI:10.1038/s41598-022-23191-z]. [IF<sub>5-letni</sub> = 5,516; MEiN= 140].

**Cel II. a) i b)** Do oceny działania przeciwbakteryjnego ekstraktów *S. cadmica* użyto trzech referencyjnych szczepów *H. pylori*: ATTC (Amerykańska Kolekcja Kultur, Rockville, Manassas, VA, Stany Zjednoczone) 700392 oraz 43504; CCUG (Kolekcja Kultur Uniwersytet w Göteborgu, Szwecja) 17874 oraz pięciu klinicznych szczepów *H. pylori*: M12 (oporny na metronidazol), M102 (oporny na metronidazol i lewofloksacynę), M91 (oporny na klarytromycynę i metronidazol), M92 (oporny na klarytromycynę) i M142 (oporny na klarytromycynę) z kolekcji szczepów klinicznych, Katedry i Zakładu Mikrobiologii, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

W badaniach *in vitro* wykorzystywałam następujące modele komórkowe: pierwotne komórki nabłonka żołądka kawii domowej, wyizolowane z wycinka tkanki żołądka tych zwierząt, pobranego za zgodą Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń Na Zwierzętach przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, powołanej przez Ministra Nauki i Edukacji (Zgoda Nr: 58/ŁB45/2016) według metody opisanej w publikacjach **Ba1-3** oraz liniowe fibroblasty tych zwierząt CRL-1405 ATTC (Amerykańska Kolekcja Kultur, Rockville, Manassas, VA, Stany Zjednoczone). Oba typy komórek kawii były traktowane scharakteryzowanymi pod względem chemicznym ekstraktami z *S. cadmica* izolowanymi z części naziemnych lub korzeni tych roślin, w stężeniu niecytotoksycznym (2,5 mg/ml i 1,25 mg/ml), wyznaczonym doświadczalnie (**publikacja C18**). W badaniach użyto LPS *H. pylori* wyizolowany ze szczepu wzorcowego *H. pylori* CCUG 17874 wg wcześniej opisanej procedury (**Westphal i wsp. 1952, Moran i wsp. 1992**) lub standardowy LPS *E. coli* (serotyp O55:B5, Sigma), oba w stężeniu 25 ng/ml, wg dawek zoptymalizowanych w poprzednich badaniach (**Mnich i wsp. 2015; publikacje Ba1-3**).

**Cel II. c) i III. a)** W celu realizacji badań wykorzystywałam monocyty człowieka THP-1 (ATCC, TIB-202, Manassas, VA, Stany Zjednoczone), które zostały przekształcone do makrofagów w środowisku forbolu myristatu acetału – PMA (*phorbol myristate acetate*), wg wcześniej opisanej metody (**publikacja C16**). Użyłam również makrofagi pierwotne wyizolowane ze szpiku kostnego kawii domowej, wg wcześniej opisanej procedury (**publikacja B6**).

W badaniach będących podstawą publikacji A5 makrofagi były traktowane LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* (kontrola) w stężeniu 1 µg/ml, ekstraktami z *S. cadmica* w stężeniu 1,25 mg/ml [**publikacja A5**]. W badaniach będących podstawą publikacji A6 makrofagi były traktowane żywymi pałeczkami referencyjnego szczepu *H. pylori* CCUG 17874 lub szczepionkowym szczepem *Mycobacterium bovis*



BCG, zawartym w preparacie okno-BCG, stosowanym do immunoterapii raka pęcherza moczowego. W badaniach stosowano proporcję bakterii do komórek eukariotycznych (MOI) równą 10:1 [publikacja A6].

Do stymulacji makrofagów zastosowano 7-dniowy cykl tzw. „treningu odpornościowego” w różnych wariantach etapu indukcji, odpoczynku i restymulacji komórek wg. Bekkering, S, i wsp. (Bekkering i wsp. 2016), w modyfikacji własnej: trening-indukcja 24h; trening-indukcja 24h i restymulacja 5 dni (czynnikiem homologicznym lub heterologicznym); trening-indukcja 24h, restymulacja 5 dni (czynnikiem homologicznym lub heterologicznym) i dodatkowa restymulacja 24h (czynnikiem homologicznym lub heterologicznym), [publikacja A5-A6].

W pierwszym etapie badań, zgodnie z normą ISO 10993-5 ustaliłam graniczną niecytotoksyczną dawkę ekstraktów *S. cadmica* dla pierwotnych komórek nabłonka żołądka i fibroblastów kawii domowej, która była równa 2,5 mg/ml (żywołność obu typów komórek powyżej 70%). Następnie zbadałam aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów z części nadziemnych lub korzeni *S. cadmica*, w stosunku do szczepów referencyjnych *H. pylori* oraz opornych na antybiotyki szczepów klinicznych. Najbardziej wrażliwy na antybakteryjne działanie ekstraktu otrzymanego z korzeni *S. cadmica* był szczep *H. pylori* M92 oporny na klarytromycynę, a najmniej wrażliwy na taki ekstrakt był szczep *H. pylori* 142 oporny na klarytromycynę. Ekstrakt z części nadziemnych *S. cadmica* wykazywał słabsze działanie hamujące wzrost i działanie bakteriobójcze w stosunku do szczepów referencyjnych *H. pylori* lub izolatów klinicznych. Najbardziej wrażliwy na ekstrakt z części nadziemnych szalwii był szczep *H. pylori* M142 - oporny na klarytromycynę oraz szczep *H. pylori* M102 - oporny na klarytromycynę i lewofloksacynę. We wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że ekstrakty z korzeni i części nadziemnych *S. cadmica* są bogate w polifenole, odpowiednio 30,344 mg/g s.m. i 29,896 mg/g s.m, a także wykazują duży potencjał antyoksydacyjny (publikacja B15). Ponadto, na modelu *in vivo* eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowej wykazaliśmy (publikacja Ba1), że zakażenie to wzmacnia stres oksydacyjny w tkance żołądka, co w późniejszym etapie zakażenia jest związane ze wzrostem liczby komórek ulegających apoptozie w powiązaniu z wydzielaniem propapoptotycznej metaloproteiny 9 (MMP-9), zarówno lokalnie (żołądek) jak i obwodowo (surowica). Również w badaniach *in vitro* na pierwotnych komórkach nabłonka żołądka i fibroblastach kawii traktowanych LPS *H. pylori* wykazaliśmy nasilenie stresu oksydacyjnego i apoptozy komórek. Ubytek komórek wskutek apoptozy może doprowadzić do zaburzenia integralności bariery nabłonkowej żołądka. Mając na uwadze taki efekt indukowany nasileniem stresu oksydacyjnego, w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori*, w kolejnym etapie badań, sprawdziłam czy ekstrakty z *S. cadmica* mogą ograniczać stres oksydacyjny i przez to obniżyć intensywność apoptozy komórek nabłonkowych oraz promować proces regeneracji takich komórek wyrażający się ich zdolnością do migracji. Wykazałam, że same ekstrakty



z *S. cadmica* nie pobudzają stresu oksydacyjnego, nie nasilają apoptozy i nie promują migracji. Wykazałam natomiast, że poziom uszkodzeń oksydacyjnych białka 3-nitrotyrozyny (3NT) **(Cruz i Fardilha, 2016)**, indukowanych w moich badaniach *in vitro*, w hodowlach komórek nabłonka żołądka kawy domowej lub fibroblastów tych zwierząt przez LPS *H. pylori*, został obniżony w środowisku ekstraktów *S. cadmica*. Zmniejszenie stresu oksydacyjnego zależnego od LPS w hodowlach komórkowych przez ekstrakty *S. cadmica* było związane z ograniczeniem apoptozy komórek. Proces ten oceniano w teście TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), umożliwiającym wykrywanie podwójnych pęknięć w DNA, oraz na podstawie poziomu proapoptycznych białek: kaspazy 3 - CC3 i białka Bax (*Bcl-2-associated X protein*). Zmniejszenie poziomu tych białek korelowało z podwyższonym poziomem białek anty-apoptycznych Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) i Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) oraz zmniejszeniem aktywacji kinazy Erk (*extracellular signal-regulated kinases*), która reguluje cykl komórkowy i proces apoptozy **(Lu i Xu, 2006)**. Osłabieniu procesu apoptozy indukowanej LPS *H. pylori*, przez ekstrakty *S. cadmica*, towarzyszył wzrost zdolności komórek nabłonkowych do migracji (utrąconej w środowisku LPS), a szybkość tego procesu była proporcjonalna do produkcji kolagenu **(Rico-Llanos i wsp. 2021)** oraz IL-33, jako mediatorów regeneracji **(publikacja C14)**.

Podsumowując, hydrometanolowe ekstrakty z *S. cadmica*, otrzymane z korzeni lub części nadziemnych, wykazywały działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec referencyjnych szczepów *H. pylori* oraz izolatów klinicznych *H. pylori* opornych na klarytromycynę, metronidazol i/lub lewofloksacynę. Zneutralizowały szkodliwy stres oksydacyjny, zmniejszając nasilenie apoptozy pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka lub fibroblastów kawy domowej oraz przywróciły zdolność migracji tych komórek utraconą w środowisku LPS *H. pylori in vitro*.

Obniżenie stresu oksydacyjnego jest kluczowe dla ochrony komórek przed uszkodzeniem DNA, prowadzącym do zmian nowotworowych, które mogą być indukowane podczas zakażenia *H. pylori*. Można zatem sądzić, że neutralizacja stresu oksydacyjnego indukowanego przez LPS *H. pylori* przez ekstrakty *S. cadmica* może sprzyjać ochronie integralności bariery komórek nabłonka żołądka *in vivo* podczas zakażenia *H. pylori*. Antybakteryjne, przeciwutleniające i antyapoptyczne właściwości ekstraktów *S. cadmica* stanowią podstawę do dalszych badań nad opracowaniem potencjalnie terapeutycznych preparatów przeciwko *H. pylori* z wykorzystaniem takich ekstraktów. Od preparatów terapeutycznych przeznaczonych do stosowania w zakażeniu *H. pylori* oczekuje się działania przeciwbakteryjnego w połączeniu z działaniem ochronnym przed uszkodzeniem bariery nabłonkowej żołądka i rozwojem przewlekłego stanu zapalnego.

Mając na uwadze, iż pałeczki *H. pylori* wykształciły wiele mechanizmów hamowania odpowiedzi odpornościowej gospodarza, w tym właściwości fagocytarnych komórek żernych, wykonałam badania mające na celu sprawdzenie czy ekstrakty *S. cadmica* z części nadziemnych lub korzeni, bogate w polifenole, a także czy prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG są zdolne do przywrócenia aktywności fagocytarnej komórek żernych osłabionej przez *H. pylori* lub komponenty tych bakterii **(Chmiela i wsp. 1997, Ramaro i Mayer, 2001, Allen 2007)**. Wzięłam pod uwagę następujące wyznaczniki: depozycję integryn powierzchniowych CD11b, CD11d, CD18, błonowych i rozpuszczalnych receptorów LPS: CD14, sCD14, wytwarzanie białka chemotaktycznego makrofagów (MCP)-1, fenotyp makrofagów M1/M2 oceniany na podstawie ekspresji odpowiednio: cząsteczek CD80/CD86 (makrofagi M1) oraz CD206/arginazy 1 (makrofagi M2), wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) w powiązaniu z wytwarzaniem glutationu, wytwarzanie indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) oraz cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1, aktywację ścieżki sygnałowej NF-kappa B i globalną metylację DNA, jako wyznacznika zmian epigenetycznych.

Wykazałam, że monocyty/makrofagi ekspozycje na żywe pałeczki *H. pylori* lub LPS *H. pylori* fagocytowały znakowane fluorescencyjnie referencyjne pałeczki *E. coli* lub pałeczki *H. pylori* słabiej niż makrofagi kontrolne hodowane w samym podłożu hodowlanym. Obserwowany efekt był powiązany z obniżeniem ekspresji na fagocytach integryn CD11b/CD11d, przy jednoczesnym wzroście poziomu ROS, iNOS i glutationu w odpowiedzi na LPS oraz obniżeniem ekspresji cząsteczki CD18 w przypadku użycia żywych pałeczek *H. pylori*. Efekt ten był odwracalny po re-stymulacji fagocytów ekstraktami z *S. cadmica* lub prątkami szczepionkowymi *M. bovis* BCG.

Analizując działanie ekstraktów *S. cadmica* wobec fagocytów wykazałam, iż same ekstrakty *S. cadmica* (z liści lub z korzeni) nie wpływały na spontaniczną aktywność fagocytarną makrofagów wywodzących się z monocytów THP-1 lub taką aktywność makrofagów szpikowych kawii domowej.

Zwiększenie aktywności żernej fagocytów taktowanych najpierw LPS *H. pylori*, a następnie re-stymulowanych ekstraktami z *S. cadmica* było związane ze zwiększoną ekspresją na makrofagach integryn CD11b/CD11d, które *in vivo* ułatwiają interakcję makrofagów z komórkami śródbłonki naczyń i są zaangażowane w proces fagocytozy **(Yao i wsp. 2019, Abdelbaqi i wsp. 2006, Ehirchiou i wsp. 2006, Ernts, 1998)**.

Ekstrakty z *S. cadmica* nie nasilały wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) oraz reaktywnych form azotu, zależnych od indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) **(Shapouri-Moghaddam i wsp. 2018)**, ale powodowały zmniejszenie wytwarzania ROS przez makrofagi ekspozycje na LPS *H. pylori*, co było związane z obniżeniem wytwarzania glutationu, potwierdzając antyoksydacyjne działanie badanych ekstraktów. Należy podkreślić, iż choć ROS i reaktywne formy azotu są zaangażowane w wewnątrzkomórkowe niszczenie czynników zakaźnych przez fagocyty, to

nadmierne wydzielanie ROS generuje stres oksydacyjny prowadzący do rozwoju patologicznej reakcji zapalnej w nabłonku. Zatem równoważenie wytwarzania ROS przez ekstrakty z *S. cadmica* może mieć kluczowe znaczenie dla ograniczenia takiej niekorzystnej reakcji podczas zakażenia *H. pylori*.

W środowisku LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* zwiększyła się na fagocytach depozycja cząsteczek CD80/CD86, natomiast poziom CD206 i arginazy 1 nie ulegał zmianie, wskazując na polaryzację komórek w kierunku makrofagów pro-zapalnych M1. Same ekstrakty *S. cadmica* nie wpłynęły na poziom ekspresji CD80/CD86 na makrofagach, natomiast depozycja CD206 i arginazy 1 uległa nasileniu, co wskazuje na promowanie przez ekstrakty *S. cadmica* polaryzacji makrofagów przeciwwzapalnych M2. O takim działaniu świadczy również obniżenie ekspresji markerów CD80/CD86 na fagocytach traktowanych LPS, ich po re-stymulacji ekstraktami z *S. cadmica* oraz nasilenie ekspresji cząsteczek CD206 i arginazy 1. Aktywność prozapalna makrofagów związana jest m.in. z produkcją TNF- $\alpha$  i IL-1 oraz białka chemotaktycznego makrofagów - MCP-1. Stymulacja makrofagów LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* indukowała wytwarzanie TNF- $\alpha$ , IL-1 i sMCP-1 oraz czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Efekty te zostały ograniczane po re-stymulacji komórek traktowanych LPS *H. pylori* ekstraktami z *S. cadmica*, które same nie pobudzały produkcji tych cytokin oraz nie wpływały na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Neutralizacja wytwarzania mediatorów prozapalnych przez makrofagi eksponowane na LPS, po re-stymulacji ekstraktami *S. cadmica*, mogła być zatem związana z zahamowaniem indukowanej LPS aktywacji ścieżki sygnałowej NF- $\kappa$ B. Prawdopodobnie polifenole zawarte w ekstraktach z *S. cadmica* są zaangażowane w modulację tej prozapalnej ścieżki sygnałowej. Brak nasilenia metylacji DNA, która jest sugerowanym markerem aktywności makrofagów typu pamięciowego, bez zmiany sekwencji DNA (Ji i wsp. 2019), w zastosowanym przeze mnie modelu badawczym z wykorzystaniem ekstraktów *S. cadmica* sugeruje, że ekstrakty z *S. cadmica* modulują aktywność makrofagów indukowaną LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*, poprzez wpływ na szlak sygnałowy NF- $\kappa$ B, a nie przez modyfikacje epigenetyczne.

W badaniach zmierzających do wyjaśnienia immunomodulującego działania szczepionkowych prątków *M. bovis* BCG, wobec makrofagów eksponowanych na pałeczki *H. pylori*, które osłabiały aktywność fagocytarną makrofagów, wykazano nasiloną ekspresję cząsteczek CD11b, CD11d i CD18 oraz receptora błonowego CD14 i rozpuszczalnej jego formy sCD14. Zwiększona aktywność fagocytarna komórek w środowisku prątków szczepionkowych *M. bovis* BCG była również związana z nasileniem wytwarzania przez fagocyty rozpuszczalnego białka chemotaktycznego makrofagów (sMCP-1). W komórkach traktowanych *M. bovis* BCG całkowity poziom metylacji DNA był istotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych, hodowanych w samym podłożu hodowlanym i ulegał również istotnemu nasileniu w hodowlach zawierających komórki eksponowane na pałeczki *H. pylori* i re-stymulowane *M. bovis* BCG. Wyniki te pozwalają sugerować, że nasilenie aktywności fagocytów po ich re-ekspozycji

na prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG może być wynikiem zmian epigenetycznych w komórkach w powiązaniu ze zjawiskiem wrodzonej pamięci immunologicznej. Jakkolwiek dalsze badania są potrzebne do wykazania czy obserwowane korzystne zmiany w aktywności makrofagów mają charakter trwały czy tylko przejściowy (Rusek i wsp. 2018). Otrzymane przeze mnie interesujące wyniki badań dotyczące właściwości immunomodulacyjnych zarówno ekstraktów z *S. cadmica* jak i prątków szczepionkowych *M. bovis* BCG są przesłanką do dalszych badań z wykorzystaniem obu formułacji na modelu *in vivo* eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowej. W tych badaniach planowane jest połączenie prezentowanych obecnie badań komórkowych z analizą surowiczych profili, z wykorzystaniem przedstawionej w I części naukowego osiągnięcia metodą spektrometrii w podczerwieni (FTIR), która umożliwi śledzenie ogólnoustrojowych wyznaczników u zwierząt otrzymujących badane formułacje, w kontekście kontroli zakażenia *H. pylori*.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań wskazują, że ekstrakty z *S. cadmica* oraz prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG nasilają aktywność fagocytarną makrofagów, co jest związane ze zwiększoną ekspresją wybranych funkcjonalnych cząsteczek powierzchniowych tych komórek i wydzielaniem białka chemotaktycznego makrofagów. Ekstrakty z *S. cadmica* posiadają także właściwości przeciwutleniające. Dzięki nim *in vivo* podczas zakażenia *H. pylori* mogą chronić tkankę żołądka przed szkodliwym działaniem ROS. Uzyskane wyniki sugerują, że ekstrakty z *S. cadmica* modulują aktywność makrofagów traktowanych LPS *H. pylori* lub standardowym LPS *E. coli* poprzez wpływ na szlak sygnałowy NF-κB. Natomiast traktowanie makrofagów THP-1 prątkami szczepionkowymi *M. bovis* BCG skutkuje zwiększeniem całkowitej metylacji komórkowego DNA, co może sugerować powstawanie zmian epigenetycznych. Takie zmiany mogą wskazywać, iż komórki przeszły proces „treningu odpornościowego”, zwiększając efektywność ich odpowiedzi na czynniki zakaźne (Ji i wsp. 2019). W przyszłości, jeśli wyniki badań *in vitro* z wykorzystaniem ekstraktów *S. cadmica* lub prątków *M. bovis* BCG zostaną potwierdzone na modelu eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych, będą mogły być podstawą opracowania nowych formułacji wspomagających leczenie zakażeń *H. pylori* poprzez działanie bakteriobójcze wobec tych bakterii, działanie przeciwoksydacyjne, proregeneracyjne oraz immunomodulujące.

**Za najważniejsze wnioski wynikające z tej części badań uważam:**

1. Wykazanie aktywności bakteriobójczej ekstraktów z *S. cadmica* wobec referencyjnych szczepów *H. pylori* oraz klinicznych izolatów *H. pylori* opornych na antybiotyki stosowane w leczeniu zakażeń wywoływanych przez te bakterie – metronidazol, klarytromocynę lub lewofloksacynę.

2. Wykazanie działania antyoksydacyjnego ekstraktów z *S. cadmica* poprzez zmniejszenie wytwarzania ROS i iNOS przez makrofagi stymulowane LPS *H. pylori*, co pozwala sugerować możliwość kontroli przez takie ekstrakty reakcji zapalnej zależnej od stresu oksydacyjnego.
3. Wykazanie roli ekstraktów z *S. cadmica* w polaryzacji makrofagów przeciwzapalnych M2 i promowanie zmiany polaryzacji makrofagów pro-zapalnych M1 indukowanej przez LPS *H. pylori*, w kierunku makrofagów M2.
4. Wykazanie, że prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG oraz ekstrakty *S. cadmica* przywracają aktywność fagocytarną tych komórek zahamowaną w środowisku LPS *H. pylori* lub żywych pałeczek *H. pylori*, co jest związane z depozycją na makrofagach cząstek CD11b i CD11d.
5. Wykazanie, że makrofagi stymulowane *M. bovis* BCG odpowiadają zwiększoną produkcją CD14, sCD14 i sMCP-1, co może mieć wpływ na pobudzenie makrofagów.
6. Wykazanie, że wytwarzanie cytokin przez makrofagi traktowane LPS *H. pylori* ulega osłabieniu w środowisku ekstraktów *S. cadmica*, co jest związane z modulowaniem przez te ekstrakty pro-zapalnej ścieżki sygnałowej NF-kappa B.
7. Wykazanie, że nasilenie aktywności fagocytarnej makrofagów wobec *H. pylori* eksponowanych na prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG jest powiązane z nasiloną metylacją DNA tych komórek.

## Literatura

1. Aaby P, i wsp. **2011**. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J. Infect. Dis.* 15, 245–252.
2. Abdelbaqi M, i wsp. **2006**. Regulation of dextran sodium sulfate induced colitis by leukocyte beta integrins. *Lab. Investig.* 86, 380–390.
3. Alexandroff AB, i wsp. **2010**. Recent advances in bacillus Calmette–Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Immunotherapy.* 2, 551-560.
4. Allaker RP, i wsp. **2002**. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol.* 51,312-317.
5. Allen LA. **2007**. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cell Microbiol.* 9, 817-828.
6. Alm RA, i wsp. **2002**. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun.* 68, 4155–4168.
7. Appelmek BJ, i wsp. **1996**. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 64,2031-40..
8. Aspholm M, i wsp. **2006**. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog.* 2, e110.
9. Backert S, i wsp. **2001**. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Molecular microbiology.* 42, 631-644.
10. Bąk-Romaniszyn L, Małecka-Panas E. **2007**. Zakażenie *Helicobacter pylori* u dzieci – przebieg kliniczny, postępowanie diagnostyczne i leczenie. *Przewodnik Lekarski.* 1,94-102.
11. Bekkering S, i wsp. **2016**. *In vitro* experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.* 23, 926–933.
12. Betten A, i wsp. **2001**. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Investig.* 108, 1221-1228.
13. Bielański W, Konturek SJ. **1996**. New approach to 13C urea breath test capsule-based modification with low dose of 13C urea in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Physiol. Pharmacol.* 47, 545–553.
14. Birkholz S, i wsp. **1998**. Decreased *Helicobacter pylori*-specific gastric secretory IgA antibodies in infected patients. *Digestion.* 59, 638-645.

15. Bitter-Suermann D, i wsp. **1981**. Linkage of total deficiency of the second component (C2) of the complement system and of genetic C2 polymorphism to the major histocompatibility complex of the guinea pig. *J. Immunol.* 127, 608–612.
16. Bor-Shyang S, i wsp. **2006**. Interaction between host gastric sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients. *The Am J Gastroenterol.* 101, 36-44.
17. Boyanova L, i wsp. **2002**. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. *Clinical microbiology and infection.* 8, 388-396.
18. Brown LM, i wsp. **2002**. *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int J Epidemiol.* 31, 638-645.
19. Chambers MG, i wsp. **2013**. Structural analysis of the oligomeric states of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *J. Mol. Biol.* 2013, 425: 524-535.
20. Chen J, i wsp. **2012**. Therapeutic vaccination with *Salmonella*-delivered codon-optimized outer inflammatory protein DNA vaccine enhances protection in *Helicobacter pylori* infected mice. *Vaccine.* 30, 5310–5315.
21. Chmiela M, i wsp. **1997**. Role of *Helicobacter pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages. *Gut.* 40, 20-24.
22. Chmiela M, i wsp. **1998**. Anti-Lewis X antibody and Lewis X-anti-Lewis X immune complexes in *Helicobacter pylori* infection. *Immunol Lett.* 61, 119-125.
23. Chmiela M, i wsp. **2003**. A link between *Helicobacter pylori* and/or *Chlamydia* spp. infections and atherosclerosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 36, 187-192
24. Chmiela M, Michetti P. **2006**. Inflammation, immunity, vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 11, 21–26.
25. Ciesielska A, i wsp. **2021**. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 78, 1233–1261.
26. Cooper EA, Knutson K. **1995**. Fourier transform infrared spectroscopy investigations of protein structure. *Pharm. Biotechnol.* 7, 101–143.
27. Covacci A, i wsp. **1993**. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 90, 5791-5795.
28. Cover TL, i wsp. **2020**. The *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System. *Trend Microbiol.* 28. 682-695.
29. Cruz DF, Fardilha M. **2016**. Relevance of peroxynitrite formation and 3-nitrotyrosine on spermatozoa physiology. *Porto Biomed. J.* 1, 129–135.
30. Czkwianianc E, i wsp. **1997**. Serological assessment *H. pylori* infection in children and adults with chronic gastritis and gastroduodenitis. *Journal of Physiology and Pharmacology. Supplement.* 48(1).
31. Czkwianianc E, i wsp. **2017**. Autoantibodies against appetite-regulating peptides influence on ghrelin level in short children exposed to *Candida albicans* colonisation and *Helicobacter pylori* infection. *Postępy Mikrobiologii. Suplement,* 56(1).
32. De Block CE, i wsp. **1999**. High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibodypositive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 4062-4067.
33. Deponte M. **2017**. The incomplete glutathione puzzle: just guessing at numbers and figures? *Antioxidants Redox Signal.* 27, 1130–1161.
34. Dore MP, i wsp. **2019**. Twice-a-day PPI, tetracycline, metronidazole quadruple therapy with Pylera® or Lactobacillus reuteri for treatment naïve or for retreatment of *Helicobacter pylori*. Two randomized pilot studies. *Helicobacter.* 24, e12659.
35. Dzierżanowska-Fangrat K, i wsp. **2005**. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. *International journal of antimicrobial agents.* 26, 230-234.
36. Ehirchiou D, i wsp. **2007**. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J. Exp. Med.* 204, 1519–1524.
37. El-Eshmawy MM, i wsp. **2011**. *Helicobacter pylori* infection might be responsible for the interconnection between type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis. *Diabetol Metab Syndr.* 3, 28.
38. Ernst JD. **1998**. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66, 1277–1281.
39. Flach CF, i wsp. **2011**. A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Vaccine.* 29, 1235–1241.
40. Franceschi F, i wsp. **2002**. Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens: possible pathogenic link between *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis. *Circulation.* 106, 430-434.
41. Freyne B, i wsp. **2015**. BCG-associated heterologous immunity, a historical perspective: Intervention studies in animal models of infectious diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109, 52–61.



42. Ghosh P, i wsp. **2021**. A novel multi-epitopic peptide vaccine candidate against *Helicobacter pylori*: in-silico identification, design, cloning and validation through molecular dynamics. International journal of peptide research and therapeutics. 27, 1149-1166.
43. Gibson JR. **1998**. Intra-strain variation in expression of lipopolysaccharide by *Helicobacter pylori*. Lett Appl Microbiol. 26, 399– 403.
44. Gomez-Cabrera MC, i wsp., **2021**. Redox-related biomarkers in physical exercise. Redox Biol. 42, 101956.
45. Grębowska A, i wsp. **2010**. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activity in human peripherol blond mononuclear leukocyte cultures. J Physiolog Pharmacol. 61, 437-442.
46. Grebowska A, i wsp. **2008**. Anti-phagocytic activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide (LPS)--possible modulation of the innate immune response to these bacteria. Pol J Microbiol. 57,185-92.
47. Hana J, i wsp. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. Biomed. Pharmacother. 129, 110393.
48. Heneghan MA, i wsp. **2000**. Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. Infect Immun. 68, 937–941.
49. Iankov ID, i wsp. **2011**. Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Vaccine. 29, 1710–1720.
50. Ishijima N, i wsp. **2011**. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. J Biol Chem. 286, 25256–25264.
51. Ivie SE, i wsp. **2008**. *Helicobacter pylori* VacA subdomain required for intracellular toxin activity and assembly of functional oligomeric complexes. Infect. Immun.76, 2843-2051.
52. Ji J, i wsp. **2019**. Methionine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via DNA methylation in macrophages. ACS Omega. 4, 2331–2336.
53. Karczewska E, i wsp. **2009**. Występowanie pierwotnej oporności *Helicobacter pylori* na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie. Post. Mikrobiol. 48,31-41.
54. Kauppinen A, i wsp. **2013**. Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. Cell. Signal. 25, 1939–1948.
55. Kleinnijenhuis J, i wsp. **2015**. Trained immunity: consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 109, 29-35.
56. Konieczna I wsp. **2012**. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. Curr Prot Pep Sci. 13, 789-806.
57. Korn T, i wsp. **2009**. IL-17 and Th17 cells. Annu Rev Immunol. 27, 485-517.
58. Kotilea K, i wsp. 2019. Epidemiology, diagnosis and risk factors of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter pylori* in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.11, 17-33.
59. Krzysiek-Maczka G, i wsp. **2013**. Molecular alterations in fibroblasts exposed to *Helicobacter pylori*: a missing link in bacterial inflammation progressing into gastric carcinogenesis? J Physiol Pharmacol. 64,77-87.
60. Krzyżek P, i wsp. **2020**. High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from pediatric and adult patients in Poland during 2016–2018. Antibiotics. 9, 228.
61. Lechowicz Ł, i wsp. **2012**. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Networks Applied to Differentiate *Escherichia coli* Strains. J. Spectrosc. 1–3.
62. Lechowicz Ł, i wsp. **2013**. The use of infrared spectroscopy and artificial neural networks for detection of uropathogenic *Escherichia coli* strains'susceptibility to cephalothin. Acta Biochim. Pol. 60, 713–718.
63. Lepper PM, i wsp. **2004**. Comparison of different criteria for interpretation of immunoglobulin G immunoblotting results for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Diagn Lab Immunol. 11, 569–576.
64. Liu Z, i wsp. **2014**. Synthesis and biological evaluation of allylated and prenylated mono-carbonyl analogs of curcumin as anti-inflammatory agents. Eur. J. Med. Chem. 74, 671–682.
65. Logan RP. **1998**. Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. Gut. 43, S47-S50.
66. Lu Z, Xu S. **2006**. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. JUBMB Life 58, 621–631.
67. Mahdavi JB, i wsp. **2002**. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. 297, 573-578.
68. Malfertheiner P, i wsp. **2008**. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. Gastroenterology. 135, 787–795.
69. Malfertheiner P, i wsp. **2012**. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut. 61,646-664.
70. Marcos NT, i wsp. **2008**. *Helicobacter pylori* induces β3GnT5 in human gastric cell lines; modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis X. J Clin Investig.118, 2325–2336.
71. Masihi KN. **2001**. Fighting infection using immunomodulatory agents. Expert Opin. Biol. Ther. 1, 641–653.
72. Matsuo Y, i wsp. **2017**. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. Toxins. 9,101.

73. Matusiak A, i wsp. **2016**. Putative consequences of exposure to *Helicobacter pylori* infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation. *Arch Med Sci.* 12, 45-54.
74. Miszczczyk E, i wsp. **2014**. Antigen-specific lymphocyte proliferation as a marker of immune response in guinea pigs with sustained *Helicobacter pylori* infection. *Acta Biochimica Polonica.* 61(2).
75. Młynarczyk K, i wsp. **2018**. Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *J Funct Foods.* 40, 377-390.
76. Mnich E, i wsp. **2018**. Treatment of *Helicobacter pylori* infections in the light of the increase of antibiotic resistance. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine.* 72, 143-158.
77. Molinari M, i wsp. Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *The Journal of experimental medicine.* 187, 135-140.
78. Moran AP, i wsp. **1992**. Compositional analysis of *H. pylori* rough-form lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 174, 1370–1377.
79. Moran AP, i wsp. **2011**. Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *60,* 1412-25.
80. Nair A, i wsp. **2019**. Plant-derived immunomodulators. New look to phytomedicine, 435-499.
81. Naumann D, i wsp. **1991**. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) In *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*; Nelson, W., Ed.; VCH: New York, NY, USA, 43–96.
82. Naumann D. **2000**. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R., Ed.; Wiley: Chichester, UK. 102–131.
83. Palczewska I, Niedzwiecka Z. **2001**. Indices of somatic development of Warsaw children and adolescents. *Med. Wieku Rozwojowego* , 5, 17–118
84. Paziak-Domańska B, i wsp. **2002**. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell Immunol.* 202, 136-139.
85. Peek RM. **2008**. *Helicobacter pylori* infection and disease: From humans to animal models. *Dis. Models Mech.* 1, 50–55.
86. Pelizon AC, i wsp. **2005**. Immunomodulatory activities associated with  $\beta$ -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiological Research.* 54, 557-564.
87. Posselt G, i wsp. **2013**. The functional interplay of *H. pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun. Signal.* 11, 77.
88. Ramarao N, Meyer TF. **2001**. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: Quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect. Immun.* 69, 2604–2611.
89. Raport WHO. **1994**. Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 7–14 June 1994. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 61, 1–241
90. Rechcinski T, i wsp. **1997**. Serological indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and health blood donors. *Microbiol. Immunol.* 41, 387–393.
91. Rico-Llanos GA, i wsp. **2021**. Collagen type I Biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers.* 13, 599.
92. Rossi G, i wsp. **2004**. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect Immun.* 72, 3252–3259.
93. Rudnicka K, et al, **2019**. Genetic polymorphisms in inflammatory and other regulators in gastric cancer: risks and clinical consequences. molecular mechanisms of inflammation: induction, resolution and escape by *Helicobacter pylori*. 53-76.
94. Rudnicka K, i wsp. **2012**. *Helicobacter pylori* antigens as potential modulators of lymphocytes cytotoxic activity. *Microbiol Immu.* 56, 62-75.
95. Rudnicka K, i wsp. **2015**. *Helicobacter pylori*-driven modulation of NK cell expansion, intracellular cytokine expression and cytotoxic activity. *Innate Immun.* 21, 127-139.
96. Rusek P, i wsp. **2018**. Infectious agents as stimuli of trained innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 456.
97. Savoldi A, i wsp. **2018**. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in world health organization regions. *Gastroenterology* 155, 1372–1382.
98. Sbrattee M, i wsp. **2006**. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors* 21, 19–35.
99. Segal E, i wsp. **1999**. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 96, 14559-14564.
100. Shapouri-Moghaddam A, i wsp. **2018**. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 6425.



101. Smith AW, i wsp. **1994**. The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 13, 153-160.
102. Smith MF, i wsp. **2003**. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5 but not TLR4, are required for *H. pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biochem.* 278, 32552-32560.
103. Stawerska R, i wsp. **2015**. Assessment of ghrelin, leptin, orexin A and alpha-MSH serum concentrations and the levels of the autoantibodies against the aforementioned peptides in relation to *Helicobacter pylori* infections and *Candida albicans* colonization in children with short stature. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism.* 21(3).
104. Stawerska R, i wsp., **2015**. Prevalence of autoantibodies against some selected growth and appetite-regulating neuropeptides in serum of short children exposed to *Candida albicans* colonization and/or *Helicobacter pylori* infection: the molecular mimicry phenomenon. *Neuro Endocrinol Lett.* 36, 458-464.
105. Tamer GS, i wsp. **2009**. *Helicobacter pylori* seropositivity in patients with acute coronary syndromes. *Dig Dis Sci.* 54, 1253-1256.
106. Thung I, i wsp. **2015**. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics Review article* : the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. 43, 514-33
107. Tiwari SK, i wsp. **2009**. Chronic idiopathic thrombocytopenia purpura and *Helicobacter pylori* eradication: A case study. *Gastroenterology.* 2, 57-59.
108. Tobias J, i wsp. **2017**. Surface expression of *Helicobacter pylori* HpaA adhesion antigen on *Vibrio cholerae*, enhanced by co-expressed enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens. *Microb Pathog.* 105, 177-184.
109. Töpfer E, i wsp. **2015**. Innate immune memory: the latest frontier of adjuvanticity. *Journal of Immunology Research.* 2015,478408.
110. Vandendriessche S, i wsp. **2021**. Complement receptors and their role in leukocyte recruitment and phagocytosis. *Front. Immunol.* 10, 2318.
111. Wang S, i wsp. **2021**. Evaluation of an attenuated *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector to control *Helicobacter pylori* infection. *Immunology Letters.* 238, 68-74.
112. Wardhana D, i wsp. **2011**. The efficacy of Bacillus Calmette–Guerin vaccinations for the prevention of acute upper respiratory tract infection in the elderly. *Acta Med. Indones.* 43, 185-190.
113. Warren JR, Marshall B. **1983**. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1,1273-1275.
114. Westphal O, i wsp. **1952**. Über die extraktion von bakterien mit phenolwasser. *Z. Nat.* 78, 148-155
115. Whary MT, Fox JG. **2004**. Natural and experimental *Helicobacter* infection. *Comp. Med. Sci.* 54, 128-158.
116. Windle HJ, i wsp. **2000**. The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 275, 5081-5089.
117. Wirth HP. **1996**. Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* isolates is related to cagA status. *Infect Immun.* 64, 4598-4605.
118. Wiśniewska M, i wsp. **2002**. Detection of specific *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stool samples in dyspeptic patients and health subjects. *Microbiology and Immunology.* 46, 657-665.
119. Xiang Z, i wsp. **1993**. Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis.* 12,739-745.
120. Yamazaki-Nakashimada MA, i wsp. **2020**. BCG: A vaccine with multiple faces. *Hum. Vaccin. Immunother.* 16, 1841-1850.
121. Yan J, i wsp. **2005**. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World J Gastroenterol.* 11, 421-425.
122. Yang W, i wsp. **2020**. Seminars in Cell & Developmental Biology Cellular evasion strategies of *Helicobacter pylori* in regulating its intracellular fate', *Seminars in Cell and Developmental Biology.* Elsevier. 0-1.
123. Yao X, i wsp. **2019**. Leukadherin-1-mediated activation of CD11b inhibits LPS-induced pro-inflammatory response in macrophages and protects mice against endotoxic shock by blocking LPS-TLR4 interaction. *Front. Immunol.* 10, 215.
124. Zarnowiec P, i wsp. **2015**. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a Tool for the Identification and Differentiation of Pathogenic Bacteria. *Curr. Med. Chem.* 22, 1710-1718.
125. Zeng M, et al, **2015**. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 386,1457-1464.
126. Zhou YP, i wsp. **2007**. Gas Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Mercury Speciation in sea food. *Anal. Sci.* 23, 793-798.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Prace naukowe nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego oraz doniesienia konferencyjne są cytowane zgodnie z wykazem opublikowanych prac naukowych (**Załącznik 3 pkt. B-D**).

### 5.1 Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Pierwsze zainteresowania badawcze miałam szansę rozwinąć w latach 2012/2013 w czasie III roku studiów licencjackich na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Podczas studiów licencjackich byłam współzałożycielką, a także przewodniczącą Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów. Miałam również możliwość udziału w ramach wolontariatu w dwóch projektach badawczych realizowanych w Zakładzie Mikrobiologii wchodzącym w skład Instytutu Biologii. W latach 2012-2013 byłam wykonawczynią w grantcie Sonata 2 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki - NCN pt.: „Wykorzystanie syntetycznych mimetyków rejonu ruchomego ureaz bakteryjnych do oceny zróżnicowania przeciwciał anti-ureazowych u osób z reumatoidalnym zapaleniem stawów” oraz w projekcie „Występowanie szczepów lekoopornych bakterii mikroflory różnych rodzajów gleby” (projekt związany z badaniami w ramach projektu statutowego dla młodej kadry, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach). Badania naukowe w ramach projektu Sonata 2 stały się podstawą pracy licencjackiej, wykonywanej w Zakładzie Mikrobiologii pod kierunkiem Dr Iwony Koniecznej, zatytułowanej „Ocena występowania przeciwciał anti-ludzkiemu receptorowi typu 11 (CCRL1) w surowicach ludzkich”, którą obroniłam w 2013 roku uzyskując tytuł licencjata biotechnologii. Wyniki będące podstawą pracy licencjackiej zostały zamieszczone w recenzowanym rozdziale monografii naukowej. Wyniki badań, w których uczestniczyłam zostały również zawarte w 4 doniesieniach konferencyjnych. Ponadto w 2013 roku wyjechałam na trzy-miesięczny staż do Karolinska Institute (Stokholm, Szwecja), gdzie realizowałam projekt badaczy pt.: „Influence of vitamin D on the growth, biofilm formation and mRNA expression by uropathogenic *Escherichia coli*”.

W tym samym roku rozpoczęłam studia magisterskie na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, na kierunku Mikrobiologia, specjalność: mikrobiologia medyczna i diagnostyka laboratoryjna. W 2014 roku zostałam laureatką Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia naukowe. Otrzymałam także wyróżnienie za działalność studencką na rzecz UŁ. W roku akademickim 2013/2014 oraz 2014/2015 otrzymałam Stypendium Rektora UŁ dla najlepszych studentów, natomiast w 2015 roku Stypendium Marszałka Województwa Łódzkiego. W 2014 roku otrzymałam również wyróżnienie za najlepsze wystąpienie ustne podczas konferencji Interdyscyplinarność – przyszłością nauki. Kontynuowałam działalność naukową zarówno w ramach Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologiczno-Immunologicznego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ oraz jako wolontariuszka w Pracowni Gastroimmunologii, w Katedrze Immunologii

i Biologii Infekcyjnej UŁ. W tym samym roku obroniłam pracę magisterką pt.: „Standaryzacja metody hodowli pałeczek *Helicobacter pylori* i oceny kolonizacji nabłonka żołądka na modelu świnek morskich”, którą wykonałam w Pracowni Gastroimmunologii, w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej, pod kierunkiem Prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmieli. W ramach realizacji pracy magisterskiej opracowany został model eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u świnek morskich wraz z wyznacznikami mikrobiologicznymi, serologicznymi, histologicznymi oraz molekularnymi do jego potwierdzenia.

Wyniki pracy magisterskiej zostały zawarte w 2 artykułach (**publikacja Bb5-6**), oraz w 2 doniesieniach konferencyjnych, a pozostała działalność naukowa została zaprezentowana w formie 10 doniesień konferencyjnych.

Po zakończeniu studiów magisterskich podjęłam studia doktoranckie (2015-2020), w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej UŁ, w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ, pod kierunkiem prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmieli. W 2018 roku ukończyłam studia podyplomowe na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, na kierunku Chromatografia i techniki pokrewne we współczesnej analizie.

Na realizację badań będących podstawą mojej rozprawy doktorskiej trzykrotnie uzyskałam dofinansowanie Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ na Zadania Badawcze dla Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich. Badania finansowane były także ze środków na działalność statutową Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ.

Rezultaty wcześniejszych badań (**publikacja Bb5-6**) – opracowanie modelu doświadczalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowej oraz wyznaczników mikrobiologicznych, histologicznych, serologicznych oraz molekularnych stały się podstawą do kontynuowania badań mających na celu poznanie mechanizmów determinujących rozwój przewlekłej reakcji zapalnej, zarówno miejscowej, jak i uogólnionej, z uwzględnieniem czynników wirulencji patogenu jak i cech gospodarza. Wiedza na temat naturalnej historii zakażenia Gram-ujemnymi pałeczkami *H. pylori* jest kluczowa dla przewidywania i zapobiegania skutkom takich zakażeń. Dlatego też podczas realizacji pracy doktorskiej, celem pogłębienia wiedzy na temat patogenezы zakażeń wywoływanych przez pałeczki *H. pylori* zasiedlające nabłonek żołądka lub dwunastnicy u ok. 50% populacji ludzkiej, podjęłam badania na modelu *in vivo* – kawii domowej, dzięki któremu można śledzić procesy odpornościowe na poszczególnych etapach zakażenia. Realizowałam również badania *in vitro* na modelu pierwotnych komórek nabłonka żołądka oraz fibroblastów kawii domowej, które umożliwiły ocenę zmian inicjowanych w odpowiedzi na komponenty *H. pylori*, na poziomie komórkowym. Celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej była ocena efektów oddziaływania pałeczek *H. pylori* oraz dobrze scharakteryzowanych rozpuszczalnych komponentów tych bakterii na komórki bariery

nabłonkowej żołądka, w kontekście uszkodzenia tej bariery, rozwoju reakcji zapalnej, inicjowania procesów naprawczych i odpornościowych. Cel pracy realizowano, w dwóch blokach tematycznych: pierwszy dotyczył efektów oddziaływania *H. pylori* na barierę nabłonkową żołądka w zakresie: kolonizacji i utrwalenia zakażenia, destabilizacji bariery nabłonkowej żołądka oraz zaburzenia procesów naprawczych (**publikacja Ba1-3**), drugi blok tematyczny dotyczył oceny ogólnoustrojowych skutków zakażenia *H. pylori* wskutek indukcji wytwarzania przeciwciał potencjalnie autoreaktywnych, w następstwie mimikry antygenowej (**publikacja Ba4-5**).

We wcześniejszych badaniach u ludzi wykazano, że pałeczki *H. pylori* kolonizują błonę śluzową żołądka wiążąc się z mucyną 5 poprzez zawarte w niej antygeny Lewis X i Lewis Y. Wiadomo także, że determinanty LeX i LeY występują również u większości izolatów *H. pylori*, w ich LPS. W związku z tym przedmiotem badań była ocena zależności pomiędzy kolonizacją *H. pylori* a nasileniem wytwarzania mucyny 5 z ekspozycją determinantów Lewis X, Y. Ponadto oceniono czy determinanty Le X,Y pałeczek *H. pylori* również odgrywają rolę w procesie adhezji.

W przeprowadzonych badaniach na modelu eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* u kawii domowych oraz modelach komórek nabłonkowych żołądka i fibroblastów tych zwierząt wykazałam, że mucyna 5 pokrywająca komórki nabłonkowe żołądka i wchodzące w jej skład determinanty LeX i LeY warunkują kolonizację *H. pylori*. Nasilenie wytwarzania mucyny i depozycja determinantów LeX i LeY w śluzie, w odpowiedzi na zakażenie, promują kolonizację *H. pylori*, co może sprzyjać rozwojowi infekcji przewlekłej. Ponadto wykazałam, że determinanty LeX i LeY *H. pylori* występujące w LPS tych drobnoustrojów pośredniczą w ich wiązaniu do nabłonka żołądka (**publikacja Ba1**). Zakażenie *H. pylori* u kawii domowych inicjuje rozwój reakcji zapalnej wczesnej, związanej z intensywnym napływem do nabłonka żołądka granulocytów, a także limfocytów TCD4+ oraz późnej związanej z gromadzeniem się limfocytów TCD8+. Nadmierna infiltracja komórek immunokompetentnych m.in. granulocytów podczas zakażenia *H. pylori*, oraz uwalnianie do środowiska komponenty *H. pylori* nasilają w nabłonku żołądka stres oksydacyjny, którego konsekwencją jest wzrost liczby komórek ulegających apoptozie. Wykazałam, że nasilenie apoptozy podczas zakażenia *H. pylori* było związane z obecnością w środowisku metaloproteiny – (MMP-9), której stężenie wzrasta lokalnie i w krążeniu. Wzrost liczby komórek ulegających apoptozie pozostawał w związku z dezintegracją bariery nabłonkowej żołądka. Wywazałam, że w późnej fazie zakażenia nasila się proces proliferacji komórek nabłonkowych żołądka, co może wskazywać na uruchomienie procesów naprawczych. Jednocześnie wykazałam, że choć w reakcji na te niekorzystne zjawiska uruchamiane są procesy naprawcze, to mogą być one modulowane negatywnie przez rozpuszczalne komponenty tych bakterii m.in. LPS (**publikacja Ba2-3**). Interesujące zatem było zbadanie jakie sygnały gospodarza indukują procesy naprawcze w modelach doświadczalnego zakażenia *H. pylori*. Wzięto pod uwagę IL-33, która jest wydzielana przez komórki

gospodarza w odpowiedzi na uszkodzenie lub stres. Mobilizuje ona komórki odpornościowe i pełni także funkcję czynnika transkrypcyjnego. Na modelu *in vivo* wykazałam wzrost ilości IL-33 w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* zarówno w tkance, jak i na obwodzie. Ponadto wykazałam znaczenie endogennej IL-33 w indukowaniu procesów naprawczych w komórkach bariery nabłonkowej, poprzez stymulację ich migracji oraz proliferacji, w powiązaniu z hamowaniem apoptozy, a także zróżnicowaną efektywność procesów naprawczych w zależności od natury komponentów *H. pylori* oddziałujących na nabłonek żołądka, w tym LPS tych bakterii (**publikacja B3**).

Wiele badań wskazuje na związek zakażeń *H. pylori* z chorobami ogólnoustrojowymi. Jako przyczynę tej zależności podaje się rozwój przewlekłej reakcji zapalnej wskutek zakażenia *H. pylori*, która może objawiać się nie tylko lokalnie w nabłonku żołądka ale także w innych narządach i na obwodzie. Jedną z potencjalnych przyczyn nasilania reakcji zapalnej może być występowanie mimikry antygenowej pomiędzy komponentami *H. pylori* i gospodarza. Przypuszcza się, że takie komponenty bakteryjne podczas zakażenia indukują powstawanie przeciwciał, które następnie krzyżowo wiążą komponenty gospodarza. Powstające kompleksy antygen-przeciwciało mogą aktywować białka dopełniacza na drodze klasycznej doprowadzając do lizy komórek i wzbudzenia reakcji zapalnej. W badaniach własnych wykazałam, że w odpowiedzi na zakażenie *H. pylori* produkowane są przeciwciała przeciwko białku HspB tych bakterii krzyżowo reagujące z białkiem Hsp60 człowieka. Przeciwciała takie wykryto w surowicach zdrowych dawców z bezobjawowym zakażeniem *H. pylori*, pacjentów z zapaleniem błony śluzowej żołądka na tle zakażenia *H. pylori*, pacjentów z chorobą niedokrwienną serca zakażonych *H. pylori* oraz w surowicach kawy domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori*. Na tym modelu potwierdziłam zależność pomiędzy zakażeniem *H. pylori* z towarzyszącą aktywną reakcją zapalną a powstawaniem takich przeciwciał. Przeciwciała anti-HspB *in vivo* mogą sprzyjać uszkodzeniu nabłonka żołądka, a także innych tkanek z ekspozycją białka Hsp60 nasilając reakcję zapalną miejscową lub ogólnoustrojową, w następstwie tworzenia kompleksów immunologicznych i aktywacji białek dopełniacza na drodze klasycznej (**publikacja Ba4-5**).

Badania naukowe realizowane przeze mnie podczas studiów doktoranckich stały się podstawą ponad 100 doniesień konferencyjnych prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych, z których 20 zostało nagrodzonych. Uczestniczyłam także w 25 szkoleniach i kursach specjalistycznych. Odbyłam również staż (06-31.08.2018r.) w Zakładzie Chemii Organicznej, Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego, Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, którego celem była analiza próbek biologicznych z wykorzystaniem metody spektroskopii w podczerwieni w transformacji Fouriera (FTIR). Te umiejętności wykorzystywałam w dalszych badaniach.

Umiejętności prowadzenia hodowli komórkowych, oceny morfologii, żywotności i proliferacji komórek, a także wyznaczania działania przeciwbakteryjnego związków aktywnych biologicznie

zaowocowały nawiązaniem współpracy z dr hab. Mariuszem Urbaniakiem, prof. UJK z Zakładu Chemii Organicznej, Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego, Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz dr Magdaleną Woźniczką z Zakładu Chemii Fizycznej i Biokoordynacyjnej, Katedry Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, której efektem było opublikowanie 4 prac oryginalnych, z moim współautorstwem (**publikacja Bb1, 3, C6, C12**).

Badania we współpracy z dr hab. Mariuszem Urbaniakiem dotyczyły oceny aktywności cytotoksycznej nowych trans- $\chi$ -Halo- $\delta$ -laktonów na modelu mysich fibroblastów L929. Wykazaliśmy, że laktony 6a (trans-5-bromo-4,4-dimetylo-6-(a-naftylo)-tetrahydro-2H-piran-2-on), 5b (trans-5-jodo-4,4-dimetylo-6-fenilo-tetra-hydro-2H-piran-2-on) oraz 7c (trans-5-chloro-6-(p-fluorofenilo)-4,4-dimetylotetrahydro-2H-piran-2-on) spełniały kryterium biogodności w stężeniu 5  $\mu\text{g/ml}$ , a także wykazywały aktywność bakteriobójczą wobec *Escherichia coli* ATCC 8739 oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 65389. Uzyskane wyniki dostarczyły cennej wiedzy na temat możliwości wykorzystania badanych laktonów jako nowych substancji o potencjale bakteriobójczym (**publikacja Bb2**). W drugiej pracy z wykorzystaniem innych modyfikacji  $\chi$ -Halo- $\delta$ -laktonów oraz  $\delta$ -Hydroksy- $\chi$ -laktonów oceniliśmy ich aktywność cytotoksyczną wobec ludzkich komórek raka żołądka (AGS). Wykazaliśmy, że wszystkie testowane laktony w stężeniu 50  $\mu\text{g/ml}$  hamują aktywność metaboliczną komórek AGS, natomiast wartość  $\text{IC}_{50}$  testowanych laktonów mieściła się w zakresie 0,0006–0,0044  $\mu\text{M}$  i były to wartości niższe niż  $\text{IC}_{50} = 0,025 \mu\text{M}$  doksorubicyny, referencyjnego leku przeciwnowotworowego. Uzyskane w tej pracy wyniki są przesłanką do dalszych badań z wykorzystaniem  $\chi$ -Halo- $\delta$ -laktonów oraz  $\delta$ -Hydroksy- $\chi$ -laktonów jako substancji hamujących rozwój komórek raka żołądka (**publikacja Bb4**).

Badania we współpracy z dr Magdaleną Woźniczką dotyczyły kompleksów w wodnym układzie kobalt(II)-kwas 2-pikolinohydroksymowy i wykluczenia toksycznego działania tego kompleksu na modelu mysich fibroblastów L929. Wykazaliśmy, że w najwyższym stężeniu 7,3 mM kompleks nie jest cytotoksyczny i nie powoduje uszkodzeń DNA, a skompleksowanie kobaltu(II) kwasem 2-pikolinohydroksymowym znosi silne działanie cytotoksyczne samego kobaltu (II) i wzmacnia aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą (**publikacja Bb1**). Rezultaty tych badań dostarczyły informacji na temat nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych przy jednoczesnym braku ich działania cytotoksycznego na komórki eukariotyczne, które mogą być wykorzystane w przyszłości jako substancje do leczenia ran przewlekle zakażonych. Druga publikacja dotyczyła kompleksów w wodnym układzie N-(2-hydroksybenzylo)alaniny ze zredukowaną zasadą Schiffa i kobaltem(II). Wykazaliśmy najlepszą aktywność bójczą badanego kompleksu wobec drożdżaków z rodzaju *Candida*, a także Gram-ujemnych bakterii *Pseudomonas aeruginosa* oraz Gram-dodatnich ziarniaków *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Badany kompleks wykazał silną aktywność cytotoksyczną na modelu



referencyjnych mysich fibroblastów L929, która najprawdopodobniej wynikała z większej dostępności centrum kobaltu(II) w strukturze czworościennej kompleksu **(publikacja Bb3)**.

Współpraca dr Magdaleną Wodniczką z Zakładu Chemii Fizycznej i Biokoordynacyjnej, Katedry Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, była kontynuowana po uzyskaniu stopnia doktora i dotyczyła oceny przeciwdrobnoustrojowych oraz przeciwnowotworowych właściwości nowych kompleksów kobaltu(II) z bioaktywnymi ligandami, kwasem 2-pikolinohydroksymowym (PicHA) i zredukowaną zasadą Schiffa N-(2-hydroksybenzylo)alaniną (PHAlaSal) lub N-(2-hydroksybenzylo)fenyloalanina (AlaSal). Badania te zaowocowały opublikowaniem dwóch prac w czasopismach z listy JCR, w których jestem współautorką **(publikacje C6, C12)**. W badaniach wykazano, że kompleks PHAlaSal (>1.82 mM) posiada lepszą aktywność bakteriobójczą niż kompleks heteroligandów Co(II)–PicHA–AlaSal (3,65 mM) wobec dwóch szczepów *Helicobacter pylori* oraz wobec drożdżaków *Candida albicans* i *Candida glabrata*, co jest istotne ze względu na potencjalne współistnienie tych mikroorganizmów w środowisku żołądka i ich rolę w rozwoju zapalenia błony śluzowej żołądka. Dwuskładnikowe kompleksy heteroligandów Co(II)–PicHA–AlaSal nie były cytotoksyczne wobec mysich fibroblastów L929, a także wobec ludzkich komórek raka żołądka (AGS), w przeciwieństwie do kompleksu PHAlaSal, który wykazywał takie działanie **(publikacje C6, C12)**. Z tego względu kompleksy zasad Schiffa nie mogą być rozważane jako formułacje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, w przeciwieństwie do kompleksów heteroligandów Co(II)–PicHA–AlaSal, ale kompleks PHAlaSal może być brany pod uwagę jako komponenta zapobiegająca wzrostowi komórek nowotworowych **(publikacje C6, C12)**.

W trakcie studiów doktoranckich byłam wykonawczynią w 6-ciu projektach badawczych o charakterze komercyjnym, realizowanych we współpracy z przemysłem (B+R) oraz w 3 projektach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Sprawowałam opiekę nad 6 Studenckimi Grantami Badawczymi UŁ, a także opiekę nad 9 pracami magisterskimi.

W wyniku przeprowadzonego postępowania konkursowego, w dniu 1.10.2019r., zostałam zatrudniona w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej na stanowisku pracownika naukowo-technicznego.

Rozprawa doktorska zatytułowana „*Patogeneza zakażeń Helicobacter pylori na modelu kawii domowych oraz modelach komórkowych in vitro*” stanowiła zestaw 5-ciu spójnych tematycznie publikacji opublikowanych w czasopismach z listy JCR **(publikacja Ba1-5)**. Rozprawa doktorska była podstawą nadania mi w dniu 22 października 2020 roku stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych przez Komisję ds. Stopni Naukowych w Dziedzinie Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, w Dyscyplinie Nauki Biologiczne, działającą na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego,. Komisja na Wniosek Recenzentów pracy przyjęła także



uchwałę o wyróżnieniu mojej rozprawy doktorskiej. W roku 2021, cykl publikacji będący podstawą mojej pracy doktorskiej został wyróżniony Indywidualną Nagrodą III stopnia Rektora UŁ, a także Nagrodą Marszałka Województwa Łódzkiego Za Pracę Doktorską Związaną z Województwem Łódzkim.

### 5.2 Kontynuacja pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, w wyniku przeprowadzonego postępowania konkursowego, w dniu 1.02.2021r., zostałam zatrudniona w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego. Zostałam także powołana do pełnienia funkcji promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr Agaty Tomaszewskiej pt.: „Mimikra antygenowa w zakażeniu *Helicobacter pylori* – rola autoprzeciwciał indukowanych w odpowiedzi na peptydy wykazujące podobieństwo antygenowe z czynnikami bakteryjnymi *Helicobacter pylori*”, (Szkola Doktorska BioMedChem, promotor: dr hab. A. Krupa). **W roku 2022 rozstałam laureatką Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla Wybitnych Młodych Naukowców.**

Bezpośrednio po zakończeniu etapu związanego z realizacją rozprawy doktorskiej kontynuowałam rozwój swoich zainteresowań naukowych dotyczących patogenezy zakażeń *H. pylori* na modelu kawii domowej oraz modelach komórkowych *in vitro*, w kontekście destabilizacji bariery komórek nabłonkowych żołądka indukowanej przez LPS tych bakterii i roli alarmowej IL-33, a także roli przewlekłego zakażenia *H. pylori* w patogenezie choroby niedokrwiennej serca (ChNS).

Zakażeniu *H. pylori* towarzyszy zaburzenie integralności bariery nabłonkowej żołądka, co może być spowodowane jej uszkodzeniem wskutek bezpośredniego oddziaływania pałeczek *H. pylori* i ich komponentów na tę barierę, zmniejszeniem wytwarzania przez komórki białek adhezyjnych i białek ścisłych połączeń, w powiązaniu z nasileniem reakcji zapalnej gospodarza. W badaniach własnych wykazałam, że istotną rolę w tych procesach odgrywa stres oksydacyjny i eliminacja komórek na drodze apoptozy (**publikacja Ba2**). W sytuacji zaburzenia homeostazy, komórki tworzące tę barierę mobilizują się do przywrócenia równowagi m.in. poprzez migrację i proliferację, co pozwala na uzupełnienie niedoborów komórkowych. W badaniach będących podstawą rozprawy doktorskiej, na modelu *in vitro* pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka kawii domowej lub fibroblastów w tzw. „teście gojenia rany” wykazałam zdolność komórek traktowanych komponentami *H. pylori*: kompleksem antygenów powierzchniowych zawartych w ekstrakcie glicynowym tych bakterii - EG, białkiem CagA lub podjednostką UreA ureazy, do zasklepienia uszkodzenia powstałego w monowarstwie komórek (**publikacja Ba2**). Natomiast w środowisku LPS *H. pylori*, podobnie jak i wzorcowego LPS *E. coli*, komórki nie migrowały i nie proliferowały, co wskazuje na zaburzenie procesu regeneracji komórek (**publikacja Ba2**). W dalszych badaniach poszukiwano odpowiedzi na pytanie jakie mechanizmy są uruchamiane w komórkach nabłonkowych żołądka gospodarza celem przywrócenia ciągłości tworzonej przez nie bariery. Wzięto pod uwagę wytwarzanie IL-33, zaliczanej do cytokin alarmowych, której stężenie

wzrasta w błonie śluzowej żołądka podczas ostrej fazy zakażenia *H. pylori* (**publikacja Ba3**). W badaniach będących podstawą rozprawy doktorskiej, wykazałam na modelu *in vivo* – kawii domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori*, że poziom IL-33 wzrasta miejscowo podczas zakażenia tymi bakteriami – w tkance żołądka, a także obwodowo – w surowicy (**publikacja Ba3**). Na modelu *in vitro* – pierwotnych komórek nabłonka żołądka i fibroblastów kawii domowej eksponowanych na EG *H. pylori* wykazaliśmy, że w odpowiedzi na zaburzenie integralności bariery nabłonkowej podczas zakażenia *H. pylori*, inicjowane są procesy naprawcze, w których pośredniczy IL-33 nasilająca migrację i proliferację komórek i zwrótnie ograniczająca proces apoptozy komórek (**publikacja Ba3**). Mając na uwadze znaczenie IL-33 w regeneracji komórek, w środowisku kompleksu antygenowego EG *H. pylori* dalsze badania zmierzały do wyjaśnienia mechanizmu hamowania tych procesów w środowisku LPS *H. pylori*. Użyłam linii pierwotnej komórek nabłonka i fibroblastów kawii domowej, nietransfekowanych lub transfekowanych siRNA IL-33, traktowanych LPS *H. pylori* w środowisku z lub bez egzogennej IL-33. Wykazałam, że komórki kontrolne nietraktowane LPS *H. pylori* migrowały w obecności IL-33, a działanie pro regeneracyjne IL-33 było związane ze stymulacją komórek do produkcji kolagenu typu I. „Gojenie rany” przez komórki eksponowane na LPS *H. pylori* było hamowane nawet w obecności proregeneracyjnej IL-33, co mogło być spowodowane zwiększonym stresem oksydacyjnym indukowanym przez LPS, a także nasileniem apoptozy w powiązaniu ze wzrostem stężenia kaspazy CC3, która ma zdolność enzymatycznego cięcia IL-33 i tym samym może inaktywować tę cytokinę o działaniu pro-regeneracyjnym. Uzyskane wyniki pozwalają również sugerować, że hamowanie migracji komórek w środowisku LPS *H. pylori* mogło być wynikiem aktywacji kinazy Erk, wydzielaniem rozpuszczalnego receptora IL-33 jakim jest sST2 oraz modulowaniem wytwarzania kolagenu I. W odpowiedzi na uszkodzenie komórek, w środowisku LPS *H. pylori*, pierwotne komórki nabłonka żołądka i fibroblasty kawii domowej odpowiadały wytwarzaniem kolagenu I, co może być korzystne w początkowym etapie regeneracji. Jednakże środowisko LPS *H. pylori* może spowalniać proces naprawy komórek barierowych żołądka, potencjalnie z powodu ingerencji LPS w aktywność proregeneracyjną IL-33, co może przyczyniać się do podtrzymywania stanu zapalnego (**publikacja C14**).

Mimikra antygenowa jest strategią wykorzystywaną przez wiele drobnoustrojów do unikania eliminacji przez efektorowe mechanizmy odpornościowe gospodarza. Hipoteza indukcji przeciwciał auto-reaktywnych przez pałeczki *H. pylori* została po raz pierwszy zasugerowana na podstawie badań, w których wykazano występowanie w surowicach niektórych pacjentów zakażonych *H. pylori* przeciwciał reagujących z komórkami nabłonkowymi żołądka w części odźwiernikowej. Podejrzewa się udział zakażenia *H. pylori* w rozwoju zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka, trombocytopenii, autoimmunologicznego zapalenia trzustki, choroby niedokrwiennej serca - ChNS, zaburzeń wzrostu

u dzieci, a także w rozwoju anemii z niedoboru żelaza. Ukazało się wiele prac opartych na badaniach serologicznych, wskazujących na związek zakażeń *H. pylori* z rozwojem ChNS. Zakażenia szczepami *H. pylori* CagA+ wykrywano znacznie częściej u pacjentów z ChNS, niż u osób bez objawów tej choroby, co może sugerować rolę takich zakażeń w rozwoju miażdżycy. W badaniach Zespołu wykazano, że przewlekła ekspozycja na zakażenie *H. pylori* u pacjentów z ChNS sprzyja wytwarzaniu przeciwciał przeciwko białku HspB tych bakterii, które krzyżowo reagują z ludzkim białkiem Hsp60, a takie przeciwciała, podobnie jak przeciwciała anty-ureazowe mogą nasilać proces zapalny w naczyniach wiążąc się z białkiem Hsp60 (TTTATVLARS), którego ekspozycja w śródbłonku naczyniowym nasila się podczas procesu zapalnego. Potwierdzenie udziału białka HspB *H. pylori* w indukowaniu u ludzi przeciwciał anty-HspB, potencjalnie auto-reaktywnych, oraz ich roli w rozwoju ChNS, wymagało dalszych badań (**publikacja Ba4**). Oceniono występowanie w surowicach osób zdrowych, pacjentów z objawami dyspepsji oraz pacjentów z ChNS, zakażonych lub niezakażonych *H. pylori*, przeciwciał przeciwko sekwencji wspólnej białka HspB tych bakterii i ludzkiego białka Hsp60. Uzyskane wyniki wskazują na znaczenie pałeczek *H. pylori* w indukcji takich przeciwciał, zwłaszcza u pacjentów z ChNS. Na modelu kawii domowych potwierdzono znaczenie eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* w indukcji takich przeciwciał (**publikacja Ba4**).

W dalszych badaniach sprawdziłam czy komponenty *H. pylori* mogą powodować wytwarzanie u pacjentów z ChNS zakażonych tymi bakteriami przeciwciał krzyżowo-reagujących z epitopami sekwencji aminokwasowej TVLLPLVIFF receptora czynnika martwicy guzów - TNFR. Cytokina ta odgrywa kluczową rolę w rozwoju reakcji zapalnej. Przetestowałam surowice od pacjentów z ChNS zakażonych *H. pylori*, surowice kontrolne - niezakażonych zdrowych dawców, a także surowice pochodzące od kawii domowych eksperymentalnie zakażonych *H. pylori* lub zwierząt niezakażonych. Badania wykazały, że u pacjentów z ChNS, a także u kawii domowych zakażonych *H. pylori* wytwarzane są przeciwciała, które reagują krzyżowo ze wspólną sekwencją TNFR występującą u pałeczek *H. pylori* i gospodarza, a wyadsorbowanie tych surowic inaktywowanymi termicznie pałeczkami *H. pylori* istotnie obniżyło poziom surowicznych przeciwciał anty-TNFR. Aktywność biologiczna takich przeciwciał wytwarzanych podczas zakażenia *H. pylori* u kawii domowych, tworzących kompleksy immunologiczne z TNFR, została potwierdzona w teście wiązania dopełniacza (**publikacja C10**).

W leczeniu ChNS stosuje się kwas acetylosalicylowy (ASA), jako antykoagulant. Jednakże taka terapia długotrwale stosowana u pacjentów z ChNS może powodować działania niepożądane objawiające się uszkodzeniem bariery nabłonkowej żołądka w wyniku cytotoksyczności ASA, co może ułatwić kolonizację *H. pylori* i przenikanie komponentów *H. pylori* do krwioobiegu, gdzie mogą one aktywować leukocyty i komórki śródbłonka naczyniowego. W badaniach na komórkach nabłonkowych żołądka - AGS oraz komórkach śródbłonka naczyniowego – HUVEC wykazaliśmy że, ASA oraz 7-

ketocholesterol (7-kCh), klasyczny czynnik ryzyka aterogenezy, doprowadzają do rozszczelnienia obu typu komórek ale efekt ten jest istotnie nasilony w środowisku komponentów *H. pylori*: kompleksu antygenowego EG, podjednostki UreA ureazy, białka CagA lub LPS, co pozostawało w związku z aktywacją ścieżki sygnałowej STAT3, nasileniem wytwarzania reaktywnych rodników tlenowych – ROS oraz apoptozy. Komórki AGS traciły zdolność do zablizniania uszkodzenia w teście gojenia rany (**publikacja C9**). Wyniki tych badań *in vitro* wskazują, że rozpuszczalne komponenty *H. pylori* wraz z ASA i 7-kCh powodują dezintegrację bariery nabłonkowej żołądka co *in vivo* podczas zakażenia *H. pylori* może sprzyjać ich translokacji do krwioobiegu, gdzie te czynniki bakteryjne same lub pod wpływem 7-kCh i ASA mogą powodować mikrouszkodzenia śródbłonka naczyniowego w wyniku podwyższenia stężenia ROS i wzmagania procesu apoptozy. Może to ułatwić utrzymanie odpowiedzi zapalnej i odkładanie się 7-kCh w śródbłonku naczyń. Taka kaskada zdarzeń może potencjalnie wiązać zakażenie *H. pylori* u pacjentów z ChNS z nadmierną odpowiedzią zapalną i procesami miażdżycowymi.

Opracowany wcześniej model doświadczalnego zakażenia u kawii domowej został użyty w badaniach *in vivo* do potwierdzenia związku między przetrwałą infekcją pałeczkami *H. pylori* (60 dni) u zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową a rozwojem stanów zapalnych, które mogą być proaterogenne (**publikacja C16**). W badaniu histopatologicznym wycinków aorty wykazaliśmy naciek komórek zapalnych do śródbłonka naczyniowego u zwierząt zakażonych *H. pylori* otrzymujących dietę wysokotłuszczową w powiązaniu z ogólnoustrojowym podwyższeniem poziomu markerów stanu zapalnego: białka C-reaktywnego - CRP oraz MMP-9. U takich zwierząt wykazano zwiększoną szczytność tętnic (**publikacja C16**), wzrost oksydowanych lipidów w śródbłonku naczyniowym skorelowany ze wzrostem stężenia LDL w surowicy, a także objawy niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD), będące wczesnym markerem procesu aterogenezy (**doniesienie konferencyjne D2, D10**). Wydaje się, że stres oksydacyjny nasilający się podczas zakażenia *H. pylori* może być istotnym bodźcem do utleniania lipidów. W takich warunkach powstają promiażdżycogenne cząsteczki, 7-kCh i aldehydy, w tym 4HNE. Można także sugerować, że komponenty *H. pylori* w połączeniu z dietą wysokotłuszczową nasilają zaburzenia metabolizmu lipidów, co koreluje ze wzrostem poziomu LDL w surowicy oraz stłuszczeniem wątroby. Oba czynniki mogą wzmacniać stan zapalny w śródbłonku naczyniowym poprzez depozycję oksydowanego LDL w ścianie naczyń krwionośnych.

Opisując wyniki badań wykonanych w ramach prac stanowiących część osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem wniosku zaznaczyłam, że jednym z najpoważniejszych problemów związanych z zakażeniami *H. pylori* jest narastająca oporność izolatów na antybiotyki stosowane w ich leczeniu. Problem ten stał się przesłanką do kontynuacji lub nawiązania nowej współpracy z dr hab. Izabelą Grzegorzczak-Karolak, dr hab. Ewelina Piątczak oraz dr Izabelą Weremczuk - Jeżyną z Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej, Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału

Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, która dotyczyła oceny działania przeciwbakteryjnego dobrze scharakteryzowanych ekstraktów roślinnych izolowanych z *Salvia bulleyana*, *Salvia cadmica*, *Rehmannia elata* oraz *Dracocephalum forrestii*. Badania te zaowocowały opublikowaniem pięciu prac w czasopismach z listy JCR, w których jestem współautorką (**publikacje C2, C11, C18, C20-21**). Wykazaliśmy, że ekstrakt z transformowanych pędów *D. forrestii* jest bogaty w polifenole, a dominującym metabolitem jest kwas rozmarynowy- 18,35 mg/g s.m. Ekstrakt wykazał wysokie bezpieczeństwo wobec referencyjnych fibroblastów L929. W teście redukcji MTT nie stwierdzono cytotoksycznego działania poniżej 50 mg/ml. W stężeniu niecytotoksycznym dla komórek eukariotycznych ekstrakt ten wykazywał najniższe minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) (10 mg/ml) wobec bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus epidermidis* i *Bacillus cereus* oraz bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* (**publikacja C21**). W dalszych badaniach ekstrakt zostanie poddany procedurze frakcjonowania celem uzyskania bardziej skoncentrowanego produktu pod względem zawartości związków bioaktywnych.

Ekstrakty izolowane z pędów *R. elata* zawierają bioaktywne glikozydy fenyloetanoidowe i irydoidowe. Wykazano, że rośliny hodowane *in vitro* w warunkach białego światła wytwarzają istotnie więcej glikozydu-harpagidu (1,08 mg/g s.m.), w porównaniu do roślin oświetlanych reflektorem PAR (0,29 mg/g s.m.). Badane ekstrakty cechowały się niską cytotoksycznością wobec referencyjnych fibroblastów-L929 w teście redukcji MTT (stężenie równe 2,5 mg/ml) i dobrą aktywnością bakteriobójczą wobec testowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (MIC = 1,25 mg/ml), co było spowodowane wysoką zawartością fenyloetanoidów i irydoidów (**publikacja C20**). Dzięki tym badaniom, pozyskaliśmy produkt do dalszych badań nad opracowaniem wieloskładnikowego preparatu o silnych właściwościach bakteriobójczych, przy jednoczesnym braku działania cytotoksycznego na komórki eukariotyczne.

Badaliśmy gatunki niefarmakopealne szafwii: *Salvia bulleyana* oraz *Salvia cadmica*, pod względem właściwości bakteriobójczych otrzymywanych z nich ekstraktów lub działania toksycznego na komórki nowotworowe. Ekstrakt *S. bulleyana* wykazał istotną aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka gruczołowego jelita grubego (LoVo), w zakresie stężeń 1-5 mg/ml, oraz jeszcze lepsze działanie cytotoksyczne wobec komórek raka żołądka AGS, w zakresie stężeń 0,5–5 mg/ml (**publikacja C11**).

Najsilniejsze właściwości przeciwoksydacyjne wykazywały ekstrakty z pędów i korzeni *S. cadmica* ze względu na dużą zawartość polifenoli, ogółem ok. 30 mg/g s.m, co przełożyło się na ich aktywność bakteriobójczą. Ekstrakty z *S. cadmica* wywierały działanie bakteriobójcze wobec *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp. i *H. pylori* (**publikacja C18**). Z uwagi na sile właściwości antyoksydacyjne i bakteriobójcze ekstraktów izolowanych z pędów i korzeni *S. cadmica*, oraz ich właściwości bakteriobójcze wobec *H. pylori* włączyłam te dwa ekstrakty do badań własnych, których

wyniki zostały szczegółowo opisane w punkcie 1 opisu osiągnięcia naukowego i stały się podstawą dwóch publikacji. Badania dotyczące w/w ekstraktów w kontekście wspomagania leczenia zakażeń *H. pylori* będą kontynuowane, a ich planowany zakres jest opisany w punkcie – dalsze plany badawcze.

Utrzymujący się trend do poszukiwania nowych związków chemicznych o aktywności przeciwnowotworowej zaowocował nawiązaniem współpracy z dr hab. Iwoną Zarzyką, Prof. PRz., z Katedry Chemii Organicznej, Politechniki Rzeszowskiej. Badania realizowane w ramach współpracy dotyczyły oceny aktywności cytotoksycznej - 3-chloro-3-fenolochilono-2,4-dionów wobec komórek raka żołądka AGS. Najsilniejszą aktywność cytotoksyczną wykazano dla 3-chloro-3-fenylcholono-2,4-dionu – wartość  $IC_{50}$  wynosiła 0,02  $\mu\text{g/ml}$ . Dla porównania,  $IC_{50}$  dla doksorubicyny, referencyjnego chemioterapeutyku przeciwnowotworowego wobec komórek AGS, wynosi 3,6  $\mu\text{g/ml}$ , czyli 10-krotnie mniej niż doksorubicyny i 9-krotnie mniej niż  $IC_{50}$  metotreksatu. Związek ten zostanie użyty do dalszych badań dotyczących mechanizmu przeciwnowotworowego działania wobec komórek AGS, jednakże z uwagi na dużą toksyczność wobec komórek eukariotycznych, powinien być zamknięty w nośniku, w celu ograniczenia jego działania na zdrowe komórki (**publikacja C4**).

Nośniki mają za zadanie odizolować toksyczny lek od zdrowych komórek i dzięki małym rozmiarom wprowadzać go bezpośrednio do komórek nowotworowych. Taka strategia może zapewnić dostarczenie mniejszej dawki leku bezpośrednio do środowiska komórek nowotworowych, zmniejszając tym samym dawkę cytotoksyczną leku. Takie podejście wykorzystuje w swoich badaniach dr hab. Marek Brzeziński, prof. CBMM z Działu Polimerów, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Dzięki nawiązanej współpracy miałam możliwość udziału w badaniach nad wnikaniem do komórek nowotworowych nano- lub mikro-cząstek polimerowych zawierających lek przeciwnowotworowy. Wyniki uzyskanych badań zostały zawarte w dwóch pracach opublikowanych z moim współautorstwem (**publikacje C13, C15**). Do badań biologicznych użyto nową rodzinę kopolimerów laktydu i eteru alilowo-glicydylowego, które zostały wykorzystane do uzyskania nanocząstek (NP) nieobciążonych lub obciążonych doksorubicyną (DOX). Testowane NP były stabilne w różnych warunkach pH, a szybkość uwalniania DOX z NP zmniejszała się wraz z malejącą wrażliwością pH. Testowane nieobciążone NP wykazywały pełną biogodność wobec referencyjnych fibroblastów L929, w teście redukcji MTT. Sprawdzono aktywność cytotoksyczną odciążonych DOX NP wobec komórek nowotworowych raka szyjki macicy (HeLa) oraz raka żołądka (AGS), a także potwierdzono ich wnikanie do komórek rakowych metodą obrazowania w mikroskopie konfokalnym. Wykazano, że NP załadowane DOX skutecznie działają cytotoksycznie wobec komórek HeLa po 24h podczas gdy wobec komórek AGS po 48h, a efekt ten wzrastał wraz ze stężeniem DOX w NP (**publikacja C13**). W drugiej pracy zastosowano „inteligentne” systemy dostarczania DOX oparte na „uwięzieniu leku” w reagującym na bodźce polimerowym rdzeniu, co pozwala na zmniejszenie



toksyczności DOX i na precyzyjne dostarczenie DOX do środowiska nowotworu. Zastosowano NP złożone z reagujących na bodźce kopolimerów L, L-laktydu /D, D-laktydu z L-proliną, a otrzymane kopolimery wykorzystano do przygotowania enancjomerycznych i stereoskompleksowanych NP, które obciążono DOX. Wyniki uwalniania leku wykazały, że (ko)polimerowe NP są wrażliwe na pH kwaśne. Obciążone DOX NP były skuteczne przeciwko komórkom AGS, HeLa, niemniej jednak ich cytotoksyczność silnie zależała od bloków budulcowych nanonośnika. Funkcjonalność L-proliny zwiększa wychwyty komórkowy enancjomerycznych NP, niemniej jednak wysoka stabilność NP warunkowana supramolekularnym sieciowaniem makrocząsteczek polilaktydów przeważa nad tym efektem, a stereoskompleksowane NP były lepiej wchłaniane przez komórki rakowe. Te korzystne cechy wskazują, że stereoskompleksowane (ko)polimerowe NP są obiecującymi kandydatami nanonośników do kontrolowanego i wydajnego dostarczania leków przeciwnowotworowych **(publikacja C15)**.

Te badania stały się przesłanką do podjęcia dalszych badań realizowanych we współpracy z dr hab. Markiem Brzezińskim, prof. CBMM nad opracowaniem biozgodnego nośnika o właściwościach bakteriobójczych wobec drobnoustrojów chorobotwórczych. W naszych badaniach wykazaliśmy, że supramolekularne hydrożele na bazie poli(alkoholu winylowego) (PVA) zawierające kwercetynę są biozgodne *in vitro* w modelu mysich fibroblastów L929 i cechuje je zdolność do eliminacji bakterii i grzybów. Te hydrożele hamują wzrost opornych na flukonazol drożdżaków z rodzaju *Candida*. Wykazują także właściwości bakteriobójcze wobec *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*. Oprócz właściwości przeciwdrobnoustrojowych hydrożelu, kolor hydrożeli zmienia się w zależności od szczepu bakterii i zależy od dyfundowania kwercetyny do podłoża **(publikacja C5)**. Wszystkie te korzystne cechy supramolekularnych hydrożeli (PVA) obciążanych kwercydyną mogą decydować o ich zastosowaniu w przyszłości, w systemach pakowania żywności dzięki działaniu przeciwdrobnoustrojowemu oraz sygnalizowaniu psucia mikrobiologicznego żywności poprzez zmianę koloru.

Nawiązana współpraca dr hab. Markiem Brzezińskim, prof. CBMM jest dalej rozwijana w zakresie otrzymania nowych nośników obciążonych związkami aktywnymi biologicznie do wspomaganie leczenia zakażenia *H. pylori* oraz hamowania wzrostu komórek raka żołądka, którego czynnikiem etiologicznym jest zakażenie tymi bakteriami. Planowany zakres badań jest dokładniej opisany w punkcie – dalsze plany badawcze.

Współpraca z dr Hari Vedha z Laboratorium Technologii Farmaceutycznych, Szkoła Chemii i Biotechnologii, SASTRA Uniwersytetu w Thanjavur w Indiach dotycząca oceny właściwości cytotoksycznych, a także wnikania do komórek nanocząstek chitozanu z tenofowirem-lekiem przeciwwirusowym załadowanych oleożelami, otrzymanych metodą suszenia rozpyłowego



zaowocowała opublikowaniem jednej pracy z moim udziałem (**publikacja C7**). Współpraca ta, dalej rozwija się w zakresie otrzymania nośników chitozanowych do wspomagania leczenia zakażenia *H. pylori*.

W okresie po doktoracie brałam również udział w badaniach dotyczących usuwania ze środowiska leków przeciwnowotworowych, które są trudne do eliminacji ze ścieków metodami konwencjonalnymi. Opracowywane są alternatywne metody uzdatniania wody np. przy wykorzystaniu grzybów. Pomimo użycia organizmów żywych do neutralizacji cytostatyków konieczne jest sprawdzenie czy produkty ich degradacji nie wykazują aktywności cytotoksycznej. Współpraca z dr Marceliną Jureczko z Katedry Biotechnologii Środowiska Politechniki Śląskiej miała na celu określenie aktywności cytotoksycznej produktów degradacji bleomycyny i winkrystyny przez grzyby białej zgnilizny (*Fomes fomentarius*, *Hypholoma fasciculare*, *Phyllotopsis nidulans*, *Pleurotus ostreatus* i *Trametes versicolor*). Na modelu mysich fibroblastów L929 wykazano, że szczepy *T. versicolor* i *H. fasciculare*, najsilniej redukowały efekt toksyczny bleomycyny. Eliminacja winkrystyny przez boczniki była także związana ze zmniejszeniem aktywności cytotoksycznej produktów degradacji leku. Wyniki te sugerują, że eliminacja cytostatyków przez boczniki jest obiecującą alternatywą dla oczyszczania ścieków. Wyniki tych badań stały się podstawą jednej publikacji, której jestem współautorką (**publikacja C19**).

Współpraca z Prof. dr hab. Wojciechem Żórawskim z Wydziału Mechatroniki i Budowy Maszyn, Politechniki Świętokrzyskiej oraz dr Anną Czernicką-Kubicką z Wyższej Szkoły Medycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego dotyczy biomateriałów przeznaczonych do regeneracji ubytków kości. Badania we współpracy z Politechniką Świętokrzyską dotyczyły powłok hydroksyapatytowych, które były natryskiwane plazmowo na blaszkach tytanowych celem zmniejszenia ryzyka zapalenia i miejscowej infekcji podczas implantacji kości. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że odległość natryskiwania plazmą podczas procesu powlekania hydroksyapatytem nie spowodowała zwiększenia właściwości cytotoksycznych i prozapalnych biomateriału (**publikacja C8**). Badania realizowane we współpracy z dr Anną Czernicką-Kubicką koncentrowały się na zastosowaniu poli(3-hydroksymaślanu) (P3HB) modyfikowanego hypromelozą (**doniesienie konferencyjne D12**), a także P3HB modyfikowanego celulozą nanokrystaliczną do przygotowania biokompatybilnych kompozytów (**doniesienie konferencyjne D13**). Wykazaliśmy, że wszystkie modyfikacje hypromelozą P3HB, w przeciwieństwie do modyfikacji P3HB celulozą nanokrystaliczną, spełniają kryterium biozgodności, wobec rekomendowanych mysich fibroblastów L929, a także komórek kostnych człowieka: osteoplastycznych komórek płodowych hFOB 1.19 oraz komórek kostniakomięsa kości Saos-2. Uzyskane wyniki badań, stały się przesłanką do dalszych modyfikacji P3HB by otrzymać kompozyt o pożądanym cechach materiałów przeznaczonym do regeneracji kości. Nawiązana

współpraca zaowocowała złożeniem projektu LIDER do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju na prace badawczo-wdrożeniowe, w którym, w przypadku pozytywnej decyzji o finansowaniu, będę głównym wykonawcą.

### 5.3 Dalsze plany badawcze

Moje dalsze plany badawcze nadal będą dotyczyły patogenezы zakażenia *Helicobacter pylori*, które zwykle przybiera formę przewlekłą. Wynika to z licznych mechanizmów unikania przez *H. pylori* mechanizmów obronnych gospodarza i oporności tych bakterii na antybiotyki, która osiągnęła alarmujący poziom. To skłania do poszukiwania nowych, alternatywnych dla antybiotyków, preparatów do leczenia zakażeń *H. pylori*. Potencjalnymi kandydatami są związki immunomodulujące, których działanie polega na wzmacnianiu mechanizmów odpornościowych gospodarza. W zakażeniu *H. pylori* takie podejście wydaje się uzasadnione, ponieważ bakterie te osłabiają aktywność komórek odpornościowych gospodarza. W badaniach będącym częścią osiągnięcia naukowego wykazaliśmy, że prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG oraz ekstrakty z *S. cadmica* (z części naziemnych lub korzeni) nasilają aktywność fagocytarną monocytów i makrofagów. *In vivo*, ze względu na kwasowość soku żołądkowego, podawane doustnie prątki/ekstrakty mogą tracić swoje właściwości immunomodulujące lub hamujące adhezję *H. pylori* do komórek nabłonka żołądka. Dlatego planowane jest wykorzystanie biogodnego nośnika, jako matrycy do ochrony prątków/ekstraktów przed niskim pH i ich degradacją enzymatyczną. Zadaniem nośnika jest też dostarczenie prątków/ekstraktów do jelita i ich uwolnienie w tym środowisku gdzie dochodzi do indukcji procesów odpornościowych. Następnie działanie tak przygotowanych nośników będzie sprawdzone we wcześniej opracowanym modelu eksperymentalnego zakażenia *H. pylori* w kontekście jego eradykacji.

Te dalsze plany badawcze będą opierały się o już nawiązane współpracy z dr hab. Ewelina Piątczak z Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej, Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (otrzymanie ekstraktów z *Salvia cadmica*), dr hab. Markiem Brzezińskim, prof. CBMM z Działu Polimerów, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Państwowej Akademia Nauk w Łodzi (otrzymywanie, charakterystyka nowych nośników dla związków biologicznie aktywnych) oraz z dr Hari Vedha z Laboratorium Technologii Farmaceutycznych, Szkoły Chemii i Biotechnologii, SASTRA Uniwersytetu w Thanjavur w Indiach (opracowanie nośników z chitozanem i jego modyfikacjami). Planując dalsze badania nawiązano również współpracę z dr Arturem Lewandowskim z Katedry Inżynierii Środowiska, Wydziału Inżynierii Procesowej i Środowiska Politechniki Łódzkiej (specjalistą od metody suszenia rozpyłowego nośników do leków), prof. dr hab. n. farm. Ewą Balcerczak z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (specjalistką w zakresie ilościowej metody PCR, która zostanie wykorzystana do śledzenia w czasie zakażenia *H. pylori* u kawii

domowych otrzymujących nośniki obarczone substancją biologicznie aktywną) oraz firmą farmaceutyczną BIOMED-Lublin, Wytwórnia Surowic i Szczepionek S.A, produkującą prątki szczepionkowe BCG.

Otrzymaliśmy finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu SONATA 18 , w którym występuję jako kierownik projektu i lider konsorcjum (Konsorcjanci: Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ; Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi oraz Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Projekt ten dotyczy opracowania nowych nośników z enkapsulowanymi substancjami pochodzenia naturalnego do wspomagania leczenia zakażenia *H. pylori*. Uzyskane wstępne wyniki badań (**publikacja C1**) są obiecujące. Opracowaliśmy nośnik polilaktydowy o strukturze stereokompleksów, w którym „zamknęliśmy” ekstrakty z *S. camika* (z części nadziemnych lub korzeni), tak by ekstrakt po podaniu kawiom domowym *per os* docierał do jelita w stężeniu wykazującym aktywność biologiczną. Korzystne właściwości tych ekstraktów zostały szeroko opisane w rozdziale dotyczącym osiągnięcia naukowego. Potwierdziliśmy biogodność opracowanych nośników na modelach komórkowych *in vitro* oraz na modelu kawy domowej (**publikacja C1**). Dalsze badania będą miały na celu użycie tych nośników w opracowanym modelu zakażenia *H. pylori* u kawy domowych, w celu oceny działania ekstraktu w kontroli zakażenia.

Złożyłam także do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju wnioski w ramach konkursu LIDER we współpracy z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi i firmą farmaceutyczną BIOMED-Lublin. Projekt dotyczy już opracowanego nośnika otrzymanego na bazie chitozanu, w którym skutecznie zamknięte zostały prątki szczepionkowe *M. bovis* BCG. Potwierdziliśmy także biogodność tego nośnika na modelach komórkowych *in vitro* i *in vivo*. Metoda enkapsulacji BCG w nośniku chitozanowym jest podstawą zgłoszenia patentowego w trakcie procedowania złożonego do Urzędu Patentowego RP. Z uwagi na podpisanie umowy o współpracy z firmą BIOMED-Lublin, wraz z klauzulą o poufności, dalsze plany badawcze związane z tym nośnikiem pozostają zastrzeżone.

Zakażenie *H. pylori* przyczynia się do rozwoju raka żołądka u ok. 1% osób zakażonych tymi bakteriami, natomiast w 85% zdiagnozowanych nowotworów tego narządu potwierdza się zakażenie *H. pylori*. Rak żołądka jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych i trzecią przyczyną zgonów związanych z rakiem na świecie, w ciągu ostatnich dwóch dekad. Leczenie opiera się na radykalnym zabiegu chirurgicznym z chemioterapią u pacjentów z wczesnym stadium żołądka, co warunkuje 90% przeżywalności w ciągu 5 lat. Większość pacjentów diagnozowana jest w zaawansowanym stadium choroby i z tego powodu musi przejść radioterapię i chemioterapię. Chemioterapia jest często nieskuteczna ze względu na rozwój oporności wielolekowej (MDR) komórek nowotworowych. Tak złe

rokowania w zakresie raka żołądka, który jest konsekwencją zakażenia *H. pylori*, skłoniły mnie do obycia 2-krotnie stażu naukowego (04-29.10.2021r. oraz 17.10-25.11.2022r.) w laboratorium Pfizer Center – University of Granada – Andalusian Board of Genomics and Oncology Research (GENYO) u dr Juana Carlosa Rodríguez-Manzanequeza, którego Zespół zajmuje się m.in. badaniami nad procesem unaczynienia komórek nowotworowych i rolą zewnątrzkomórkowych proteaz w mikrośrodkowisku guza, a także poszukiwaniem nowych strategii leczenia nowotworów.

Uzyskaliśmy wstępne wyniki badań, które wskazują że nanocząsteczki z resztami histaminowymi i doksorubicyną są bardziej cytotoksyczne wobec komórek raka żołądka AGS niż sam chemioterapeutyk, co może być związane z rozszczelnieniem połączeń ścisłych w komórkach AGS. Taki efekt może warunkować lepsze wnikanie leku do komórki (**publikacja C3**).

W perspektywie, zamierzam wystąpić o finansowanie projektu badawczego, dedykowanego Doktorantowi, w którym planuję rozwinąć badania nad rolą nanocząsteczek obciążonych resztami histaminowymi oraz doksorubicyną w hamowaniu angiogenezy oraz nasilania apoptozy w hodowlach 3D komórek raka żołądka – AGS, indukowanych żywymi pałeczkami *H. pylori* lub ich rozpuszczanymi komponentami. Następnie na modelu myszy zostanie oceniona ich biozgodność i biodystrybucja. Badania te będą realizowane we współpracy z dr Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque z laboratorium GENYO oraz dr hab. Markiem Brzezińskim, prof. CBMM. Po uzyskaniu satysfakcjonujących wyników na modelu *in vitro* i potwierdzeniu biozgodności *in vivo* badanych nanocząstek badania będą kontynuowane. Planujemy opracowanie projektu w oparciu o wyniki badań wstępnych celem aplikowania o grant Komisji Europejskiej (ERC). W projekcie przewidujemy ocenę skuteczności przeciw-nowotworową nanocząsteczek obciążonych resztami histaminowymi i doksorubicyną na modelu raka żołądka u myszy.

#### **5.4 Omówienie osiągnięć dydaktycznych, popularyzujących naukę i organizacyjnych.**

Istotną część mojej pracy na Uniwersytecie Łódzkim stanowi działalność dydaktyczna, popularyzowania nauki oraz działalność organizacyjna.

Obecnie jestem promotorem pomocniczym w jednym przewodzie doktorskim. Prowadzę ćwiczenia kursowe dla studentów studiów stacjonarnych na UŁ, na kierunkach: Mikrobiologia, Biotechnologia i Biologia (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska). Prowadzę zajęcia z następujących przedmiotów: Mikrobiologia lekarska: Biotechnologia mikrobiologiczna, Mikrobiota człowieka, Patogeny bakteryjne, Procedury diagnostyki mikrobiologicznej w biotechnologii, Podstawy diagnostyki zakażeń, Diagnostyka zakażeń, Zasady diagnostyki mikrobiologicznej oraz Immunologii: Serologia ztransfuzjologią, Podstawy immunologii, Immunologia, Metody obrazowania mikroskopowego w immunologii, Kultury tkankowe i komórkowe zwierząt, Modele zwierzęce w nauce i praktyce. Dla studentów studiów niestacjonarnych na kierunku Biologia prowadzę przedmiot Mikrobiologia

szczegółowa. Współuczestniczyłam w modyfikacji programu studiów, w zakresie tzw. modułów wybieralnych zajęć. Byłam bezpośrednim opiekunem pięciu studentów realizujących granty studenckie finansowane w ramach konkursu Studenckie Granty Badawcze UŁ. Obecnie jestem opiekunem dwóch studenckich projektów badawczych, które uzyskały finansowanie w ramach tego konkursu. Sprawowałam bezpośrednią opiekę nad dwunastoma pracami magisterskimi oraz wypromowałam jedną pracę licencjacką. Za prowadzone przeze mnie zajęcia uzyskuję corocznie wysokie oceny w ankietach studenckich. Kilukrotnie prowadziłam/współprowadziłam warsztaty w ramach działań promujących Uniwersytet Łódzki: „Uniwersytet Zawsze Otwarty”, Festiwal Nauki, Techniki i Sztuki UŁ oraz Noc Biologów UŁ. Brałam udział w pracach komitetów organizacyjnych dwóch konferencji (jednej krajowej- Mikrobiologia w Medycynie, Przemysle i Ochronie Środowiska Łódź, 24-25.09.2015r. i jednej międzynarodowej - MIKROBIOT 2017 Microbiology in Health Care and Environmental Protection”, Łódź, 19-20.09.2017r.), organizowanych przez Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii UŁ. Prowadziłam także zajęcia w języku angielskim dla studentów odbywających praktyki w ramach międzynarodowej wymiany IAESTE. W 2023 roku sprawowałam opiekę naukową nad studentem podczas stażu w ramach projektu Students' POWER.

### Podsumowanie całkowitego dorobku naukowego

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe w formie spójnego cyklu publikacji	Liczba Publikacji	Punkty MEiN z dn. 9 lutego 2021	IF (5 letni)
	<u>6</u>	<u>900</u>	<u>32,654</u>
<b>Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych (bez publikacji włączonych do osiągnięcia naukowego), w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>			
<i>A Przed uzyskaniem stopnia doktora</i>	12	1220	50,232
<i>B Po uzyskaniu stopnia doktora</i>	21	2610	108,331
<b>łącznie</b>	<b>33</b>	<b>3830</b>	<b>158,563</b>
<b>Liczba publikacji (łącznie)</b>	<b>39</b>	<b>4730</b>	<b>192, 217</b>
Liczba cytowań (Web of Science) z dnia 06.05.2023r.	300		
Liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science)	187		
Liczba cytowań osiągnięcia naukowego	26		
Index Hirscha	11; 8 (bez autocytowań)		
Liczba projektów badawczych	<i>Kierownik</i> 6	<i>Wykonawca</i> 11	<i>Opiekun(SGB)</i> 7
Liczba zgłoszeń patentowych	1		
Kursy i szkolenia specjalistyczne	78		
Doniesienia konferencyjne	<i>Międzynarodowe</i>		<i>Krajowe</i>
<i>A Przed doktoratem</i>	58		68
<i>B Po doktoracie</i>	11		9
<b>łącznie</b>	<b>141</b>		