INSTYTUT GRUŹLICY I CHORÓB PŁUC

Zakład Mikrobiologii
Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy
Kierownik Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

01-138 Warszawa ul. Płocka 26
Tel./ fax. + 22 4312182, e- mail: e.kopec@igichp.edu.pl

Warszawa, 18.05.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć
Kierownik Zakładu Mikrobiologii IGiCHP
Warszawa ul. Płocka 26

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Michała Piotrowskiego pod tytułem „Wpływ prebiotyków na adhezję bakterii beztlenowych do ludzkich komórek jelita grubego i badanie biofilmu *Clostridium difficile*".

Microbiota jelitowa człowieka jest złożonym, dynamicznym i przestrzennie niejednorodnym ekosystemem zamieszkałym przez niezliczoną ilość mikroorganizmów wchodzących w interakcje pomiędzy sobą oraz gospodarzem. Pomimo dynamicznego w ciągu ostatniej dekady, rozwoju badań nad microbiota jelitową wiedza na temat roli odgrywanej przez tę zróżnicowaną społeczność mikroorganizmów jest wciąż ograniczona. Aby lepiej zrozumieć jej rolę w zdrowiu i chorobie konieczna jest ich kontynuacja.

Przewód pokarmowy człowieka posiada ogromną powierzchnię wynosząca od 250 do 400 m^2. Powierzchnia ta ułatwia procesy trawienia i wchłaniania. Posiada receptory, do których mikroorganizmy przylegają, co ułatwia im kolonizowanie przewodu pokarmowego. Szacuje się, że przewód pokarmowy kolonizuje około 100 bilionów mikroorganizmów, - bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków. Połączony genom wszystkich drobnoustrojów znajdujących się w przewodzie pokarmowym to >3 milionów genów, dla przypomnienia

genom człowieka liczy „tylko" 23 000 genów. Mikroflora jelitowa często określana jest jako „super-organizm", który uwalnia biologicznie aktywne cząsteczki oraz jako „wirtualny narząd dokrewny", wywierający silny i różnorodny wpływ na fizjologię człowieka. Szacuje się, że masa microbiota jelitowej to około 2 kilogramy czyli więcej niż masa wątroby, która jest największym narządem wewnętrznym. Obecnie wiadomo, że microbiota nie tylko odgrywa rolę w syntezie użytecznych biologicznie aktywnych cząsteczek, ale jest ściśle zaangażowana w modulowanie odpowiedzi immunologicznej.

Zaburzenie normalnej mikroflory jelitowej może prowadzić do braku równowagi w relacjach między gospodarzem a mikroorganizmem. Liczne badania dostarczyły dowodów na to, że zmiana w składzie mikroflory komensalnej mikrośrodowiska jelitowego czyni ją bardziej podatną na adhezję patogenów. Stan braku równowagi mikrobiologicznej wywiera niekorzystny wpływ na gospodarza i określany jest jako dysbioza. W przypadku dysbiozy przy zaburzonej równowadze gatunków w microbiota występuje zwiększone ryzyko niektórych chorób, w tym choroby Parkinsona, autyzmu, otyłości, cukrzycy i pewnych reakcji autoimmunologicznych.

Dysbioza może być szkodliwa dla gospodarza, prowadząc do zapalenia i uszkodzenia tkanki śluzowej, które predysponują do stanów patologicznych, takich jak zakażenie *Clostridium difficile* (obecnie *Clostridioides difficile*) lub nieswoiste zapalenie jelit.

Jednym z czynników prowadzących do zakłócenia równowagi microbiota jest nadużywanie antybiotyków, które może powodować zaburzenia przewodu pokarmowego i rozwój zakażenia wywołanego *Clostridioides difificile.*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy niezwykle istotnego zagadnienia jakim jest wpływu prebiotyków na adhezję oraz formowanie biofilmu przez *C. difficile* oraz szczepy z rodzaju *Bacteroides.*

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Hanny Pituch wybitnej polskiej specjalistki w zakresie patogenezy i epidemiologii zakażeń *Clostridioides difficile* oraz badań dotyczących wpływu substancji pochodzenia naturalnego na biofilm bakteryjny, co z góry gwarantowało wniesienie znacznego wkładu wiedzy w zaplanowane badania.

Rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z nowymi wytycznymi wynikającymi z nowelizacji Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w

zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. Rozprawa ta jest zbiorem trzech oryginalnych powiązanych tematycznie artykułów, opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej: *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *Future Microbiology*, *Microbes and infection*. Należy podkreślić, że mgr Michał Piotrowski jest w tych trzech pracach pierwszym autorem. Łączny IF publikacji wynosił 8,702, a liczba punktów MEiN 300. Na podstawie załączonych objaśnień, co do roli poszczególnych współautorów wynika, że Doktorant miał znaczący wkład w wykonanie badań oraz znaczący wkład intelektualny w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów pracy.

W pracy dotyczącej wpływu **fruktooligosacharydów (FOS) i mannozy (MAN) na adhezję *Clostridium difficile* i tworzenie biofilmu w zależności od stężenia** Autorzy badali czy prebiotyki czyli substancje, których organizm ludzki nie trawi, oddziałują na adhezję i tworzenie biofilmu *in vitro* przez szczepy *Clostridioides difficile*. Wśród badanych substancji o właściwościach prebiotyku największy potencjał antyadhezyjny wykazano w przypadku FOS i MAN. Stwierdzili, że oba prebiotyki w stężeniu 8% obniżały wzrost biofilmu. Natomiast przy niskich stężeniach 1% zaobserwowali wzmożony jego wzrost. Jednak wizualizacja tego biofilmu z użyciem laserowej mikroskopii konfokalnej wykazała zmienioną, heterogenną strukturę z obecnością agregatów. Wykazano, że prebiotyki wpływają na adhezję i tworzenie biofilmu *C. difficile* w zróżnicowany sposób, w zależności od ich stężenia.

Mam pytanie do Doktoranta. Czy stosowanie odpowiedniej diety w tym prebiotyków, w trakcie antybiotykoterapii mogłoby wpływać na ograniczenie ryzyka rozwoju i nawrotu zakażenia *C. difficile*?

W kolejnej pracy dotyczącej wpływu prebiotyków na biofilm bakterii z rodzaju *Bacteroides* oraz efekt synbiotyczny w stosunku do *C. difficile* Autorzy przedstawili wyniki badań wpływu siedmiu prebiotyków i kandydatów na prebiotyk na adhezję i wytwarzanie biofilmu przez szczepy bakterii beztlenowych należących do gatunków *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* wchodzących w skład microbiota jelitowej człowieka. Zaobserwowali, że inkubacja *C. difficile* ze szczepami *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* powodowała znaczące zahamowanie adhezji *C. difficile*. W pracy tej Autorzy po raz pierwszy opisali synbiotyczny

wpływ bakterii z rodzaju *Bacteroides* o potencjalnych właściwościach probiotycznych w połączeniu z prebiotykiem FOS na adhezję oraz tworzenie biofilmu przez *C. difficile*.

Cykl monotematycznych publikacji kończy praca dotycząca **działania prebiotyków pochodzących z mleka ludzkiego 3'-sialyllaktozy i 6'-sialyllaktozy na adhezję i tworzenie biofilmu przez *Clostridioides difficile***. Autorzy w wyniku przeprowadzonych badań *in vitro* zaobserwowali, że kluczową rolę w adhezji *C. difficile* odgrywają białka ściany komórkowej Cwp84 i Cwp66 a oligosacharydy mleka ludzkiego (HMOs, ang. *human milk oligosaccharides*) mogą ją hamować. Zdjęcia biofilmu wykonane przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego uwidoczniły zmiany w strukturze biofilmu zachodzące pod wpływem HMOs. Są to pierwsze opublikowane wyniki na temat wpływu HMOs na adhezję oraz tworzenie biofilmu przez *C. difficile*.

Doktorant w przygotowanym wstępie zadeklarował w związku z uzyskaniem interesujących wyników kontynuację badań dotyczących wpływu różnych HMOs na *C. difficile*.

Mam w związku z tym pytanie. Czy preparaty zawierające HMOs mogłyby mieć zastosowanie w zwalczaniu zakażenia *C. difficile*?

Na czym polegać mógłby efekt działania HMO?

Które z preparatów probiotyki czy prebiotyki mogą mieć bardziej korzystny wpływ na modulowanie microbiota jelitowej?

Czy probiotyki mogą utrudniać odnowę microbiota po antybiotykoterapii?

Zbiór prac poprzedzony jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz 24 stronicowym wstępem, który wprowadza czytelnika w obecny stan wiedzy na temat microbiota jelita grubego. Wiedza ta dotyczy różnorodności składu mikrobiota i jej wpływu na zdrowie gospodarza, mechanizmu i terapii zakażeń wywołanych przez *Clostridioides difficile* CDI, oraz wpływu prebiotyków na mikrobiota jelita.

Doktorant we wstępie do rozprawy doktorskiej zaznaczył, że podstawą do rozpoczęcia i zaplanowania badań była ograniczona wiedza dotycząca:

- stosowania prebiotyków oraz synbiotyków w leczeniu oraz profilaktyce pacjentów z CDI oraz

- wpływu prebiotyków na adhezję oraz formowanie biofilmu przez *C. difficile* oraz szczepy z rodzaju *Bacteroides*.

Chciałabym podkreślić, że wprowadzenie napisane jest przez Doktoranta w sposób zwięzły mimo, że zakres tematyczny wstępu jest bardzo szeroki. Ta część rozprawy jest nie mniej ciekawa niż zawarte w niej prace oryginalne. Po przeczytaniu wstępu jasne stają się ogólne cele pracy, a wybór celów dodatkowych dobrze uzasadniony.

Cel ten został zrealizowany poprzez:

1. Zbadanie wpływu wybranych prebiotyków i kandydatów na prebiotyki na adhezję patogenu ludzkiego *C. difficile* oraz szczepów z rodzaju *Bacteroides* wchodzących w skład microbiota przewodu pokarmowego, do ludzkich komórek nabłonka jelita grubego *in vitro*.
2. Zbadanie wpływu prebiotyków w tym HMOs i kandydatów na prebiotyki na tworzenie biofilmu przez szczepy *C. difficile*.

Dodatkowe cele realizowano poprzez;

1. Zbadanie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *Bacteroides* sp. w celu wybrania szczepu o najlepszych pod tym względem właściwościach do dalszych badań.
2. Zbadanie synbiotycznego działania prebiotyku ze szczepem *Bacteroides* sp. Na adhezję i tworzenie biofilmu przez *C. difficile*.
3. Sprawdzenie w jaki sposób prebiotyki działają na bakterie patogenne tj. szczepy enterotoksynotwórcze *Bacteroides fragilis* (ETBF) powodujące biegunki u ludzi.
4. Określenie wpływu wybranych HMOs na ekspresję genów *cwp84* i *cwp66* kodujących białka biorące udział w adhezji *C. difficile*.

We wstępie, co warte jest podkreślenia, Doktorant przedstawił skrócony opis materiałów i metod który zawiera: opis szczepów *C. difficile* i *Bacteroides* sp. zastosowanych w badaniach, przygotowanie prebiotyków i kandydatów na prebiotyki, hodowle linii komórkowych oraz metody badania adhezji komórek bakteryjnych do linii komórkowych, biofilmu bakteryjnego oraz wpływu HMOs na ekspresję genów cwp66 i cwp84.

Analizując przedstawione przez Doktoranta na zakończenie Podsumowanie, można jednoznacznie stwierdzić, że w zaplanowanych badaniach osiągnięto cel jakim było zbadanie

wpływu prebiotyków na adhezję *C. difficile* oraz wykazanie, że obecność w microbiota jelita pałeczek jelitowych *Bacteroides* sp. w połączeniu z prebiotykiem może mieć znaczenie w profilaktyce CDI.

Cele pracy zostały zrealizowane i podsumowane w 11 dobrze zredagowanych wnioskach z których wynika, że stosowanie prebiotyków może ułatwić odbudowę zdegradowanej microbiota oraz hamować adhezję patogenów do komórek gospodarza.

Chciałabym podkreślić, że praca doktorska Pana mgr Michała Piotrowskiego wnosi znaczący wkład do zagadnień związanych z regulowaniem składu microbiota poprzez zastosowanie prebiotyków, probiotyków i synbiotyków oraz określenie ich wpływu na zdrowie człowieka.

Prebiotyki spożywane w odpowiednich ilościach mogą przyczynić się poprawy zdrowia. Jednak wiele pytań dotyczących ich stosowania w zaburzeniach żołądkowo-jelitowych pozostaje bez odpowiedzi, w tym jakie są optymalne dawki, czas trwania leczenia, efekty fizjologiczne i immunologiczne oraz bezpieczeństwo u osłabionych pacjentów. Mimo to warto wziąć pod uwagę rosnącą liczbę badań dotyczących roli prebiotyków w różnych zaburzeniach żołądkowo-jelitowych i tendencję do uznawania ich za ważną terapię uzupełniającą

Połączenie w jedną, spójną całość trzech prac umożliwia przy tym prześledzenie tych poszukiwań przez Doktoranta. Waga i znaczenie uzyskanych przez Doktoranta wyników zostało potwierdzone publikacjami unikalnymi w skali światowej w renomowanych czasopismach międzynarodowych.

Podsumowanie

Zaplanowane i przeprowadzone przez Pana mgr Michała Piotrowskiego badania wskazują na to, że jest on samodzielnym pracownikiem naukowym, a wyniki Jego badań stanowią istotny wkład do nielicznych na świecie publikacji dotyczących wpływu prebiotyków na adhezję bakterii chorobotwórczych ze szczególnym uwzględnieniem *Clostridioides difficile.*

Jako Recenzent stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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. 5 z późn. zm.).

Gratulując Doktorantowi Promotorowi i Promotorowi pomocniczemu zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Michała Piotrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na innowacyjny charakter prac stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Michała Piotrowskiego wnioskuje o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab.n. med.
Ewa Augustynowicz-Kopeć

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc