Ocena rozprawy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu: „WPŁYW PREBIOTYKÓW NA ADHEZJĘ BAKTERII BEZTLENOWYCH DO LUDZKICH KOMÓREK JELITA GRUBEGO I BADANIE BIOFILMU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*" Pana mgr Michała Piotrowskiego, doktoranta Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotor prof. dr hab. Hanna Pituch; promotor pomocniczy dr n. med. Dorota Wultańska

Genialne obserwacje Ludwika Pasteura ujawniły obecność bakterii, wirusów i umożliwiły określenie ich roli w obszarze, najbardziej dotkliwym dla człowieka – epidemiologii chorób zakaźnych. Przez wieki skupiano się wyłącznie na badaniu właściwości chorobotwórczych mikroorganizmów. Stosunkowo niewielkie sukcesy towarzyszyły mikrobiologii w gromadzeniu wiedzy na temat drobnoustrojów określanych pojęciem flory fizjologicznej zasiedlającej nasz organizm.

Dopiero gwałtowny rozwój technik molekularnych wspieranych komputeryzacją i osiągnięciami elektroniki dostarczyły narzędzi, które pozwoliły poznać bliżej wspomnianą dziedzinę mikrobiologii.

Dzięki najnowszym badaniom możemy we właściwy sposób zrozumieć znaczenie bakterii znajdujących się w naszym organizmie.

Szczególnie dużą rolę przypisuje się drobnoustrojom zasiedlającym przewód pokarmowy, które funkcjonalnie podniesiono nawet do rangi osobnego narządu.

Flora jelitowa uczestniczy w licznych, poprzez bardzo złożone relacje, procesach w naszym organizmie: takich jak trawienie, wytwarzanie witamin, produkcja enzymów, modulowanie zjawisk immunologicznych, obrona przed czynnikami patogennymi, ochrona przed rozwojem nowotworów. Bakterie znajdujące się w jelitach obejmują liczne gatunki i charakteryzują się osobniczo zróżnicowanym składem, co jest następstwem diety, zwyczajów kulinarnych, lokalizacji geograficznej, stosowania antybiotyków, terapii innymi lekami, zabiegów chirurgicznych, przebytych chorób, stosowania używek – tytoniu lub innych substancji oraz licznych innych czynników. Bogactwo i szerokie zróżnicowanie profilu bakteryjnego flory jelitowej jest wskaźnikiem dobrostanu zdrowotnego i określane jest mianem eubiozy – stanu równowagi ekosystemu zabezpieczającego przed rozwojem chorób.

Przeciwstawnym stanem jest dysbioza – następuje wówczas utrata równowagi biologicznej, różnorodność gatunkowa ulega ograniczeniu, nadmiernie namnażają się i zyskują przewagę ilościową drobnoustroje patogenne – pojawiają się objawy kliniczne symptomatyczne dla określonych schorzeń.

Dysbioza może manifestować się nie tylko *in situ*, lecz także pozajelitowo. Liczne analizy mikrobioty i pozostałych składowych bariery jelitowej dokonane z wykorzystaniem metod molekularnych potwierdzają, iż skład ekosystemu jelitowego w przebiegu autyzmu lub chorób neurodegeneracyjnych jest istotnie zmieniony w porównaniu z osobami bez tych zaburzeń. Najnowsze badania pozwalają poznać mechanizmy za pośrednictwem których, mikrobiota wpływa na funkcjonowanie mózgu i które mają wpływ na nasze zachowanie, nastrój oraz procesy poznawcze.

W licznych badaniach podejmuje się próby określenia znaczenia zmian w składzie mikrobioty na patogenezę i przebieg chorób ośrodkowego układu nerwowego, takich jak: depresja, spektrum zaburzeń autystycznych, schizofrenia, stwardnienie rozsiane, choroby Parkinsona i Alzheimera.

Coraz więcej dowodów wskazuje, że rozregulowanie interakcji mikrobiota-gospodarz wiąże się z różnymi chorobami, w tym chorobami zapalnymi jelit, rakiem jelita grubego, cukrzycą i marskością wątroby. Ostatnio, badania doprowadziły do zmiany terapii nowotworów, uwzględniając interakcję między bakteriami a lekami przeciwnowotworowymi. W celu poprawy skuteczności i bezpieczeństwa farmakoterapii konieczne jest wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania mikrobioty na farmakodynamikę i farmakokinetykę leku w organizmie.

Spektakularną ilustracją niebezpieczeństw wynikających z zaburzeń w składzie flory bakteryjnej jelita grubego, są zachorowania o etiologii *C. difficile*. Zakażenie *C. difficile* (CDI) stało się głównym zakażeniem związanym z opieką zdrowotną. Liczba zachorowań, hospitalizacji i śmiertelności wzrasta. Zgłaszane wskaźniki śmiertelności przypadków wynoszą **6%–30%** i wydają się rosnąć. Najnowsze badania dotyczące groźnej biegunki wywołanej przez *C. difficile* pozwoliły odkryć nieznany sposób, w jaki bakterie – i prawdopodobnie inne podobne – wywołują ciężką chorobę. *C. difficile* jest najczęstszym zakażeniem szpitalnym i w Stanach Zjednoczonych, szacuje się iż powoduje 453 000 przypadków rocznie, z liczbą 29 300 zgonów. Śmiertelność związana z ciężkim przebiegiem choroby wśród pacjentów wymagających leczenia w OIT, i w przypadku zakażeń hiperwirulentnym szczepem osiąga nawet 16%.

Leczenie bywa niekiedy bardzo trudne – poza dotychczas standardowo przyjętymi metodami leczenia przeciwbakteryjnego, poszukiwane są inne metody: jak drastyczna metoda przeszczepu kału zdrowych osobników, poszukiwanie nowych, bardzo aktywnych leków przeciwbakteryjnych, przykładem są nowe peptydy tiazolilowe (nokatiacyna i tiozomycyna) o wysoce selektywnym działaniu na *C. difficile*, zwłaszcza w porównaniu do *Bacteroides fragilis*, czy nowy preparat – auranofina. W opracowaniu są również procedury profilaktyczne – szczepionki.

Bardzo interesujące są szeroko prowadzone prace nad stosownym sposobem żywienia przywracającym prawidłowy status flory jelitowej. Wydaje się że ta ostatnia metoda może stanowić, w dalszej perspektywie, podwaliny indywidualizowanej medycyny z wykorzystaniem mikrobioty, która może znaleźć zastosowanie w eliminowaniu bardzo wielu chorób.

Sądzę, iż przedstawiony zakres zagadnień, jednoznacznie i czytelnie wskazuje na „wyczucie" naukowe Doktoranta podejmującego tematykę badań aktualnie znajdujących się w kluczowym centrum zdrowia publicznego – tematykę: mikrobiota przewodu pokarmowego i tematykę zakażeń *C. difficile*.

Przedstawiona do recenzji praca stanowi spójną całość trzech publikacji i rozpoczyna się streszczeniem zawierającym krótkie i rzeczowe informacje pozwalające zapoznać się z tematyką doktoratu.

Z kolejnego fragmentu pracy stanowiącego wstęp, dowiadujemy się o roli i funkcjach mikrobioty przewodu pokarmowego, o problemach zdrowotnych wynikających z zakażenia bakterią *C. difficile*. Szeroko omówiono metody terapii oraz żywieniowe metody profilaktyki CDI, przy czym Autor zwrócił uwagę na niedostatek naszej wiedzy dotyczącej stosowania prebiotyków i synbiotyków, co jest efektem niewielu badań w tym obszarze. Stąd zainteresowanie Doktoranta wspomnianą tematyką.

W dalszej części Autor omawia wykonane przez siebie badania, stanowiące przedmiot publikacji składających się na treść niniejszego doktoratu.

Pierwsza z nich dotyczy wpływu oligosacharydów i mannozy na adhezję *C. difficile* i tworzenie biofilmu. Ocenie poddano pięć prebiotyków i kandydatów na prebiotyki z których największy potencjał antyadhezyjny wykazano w przypadku fruktooligosacharydu i mannozy. Substancje te wpływały również na wzmożony wzrost biofilmu.

Wpływ prebiotyków na biofilm bakterii z rodzaju *Bacteroides* oraz efekt synbiotyczny w stosunku do *C. difficile* to przedmiot kolejnej publikacji Doktoranta.

Wyniki badań dotyczyły wpływu siedmiu prebiotyków i kandydatów na prebiotyk na adhezję i wytwarzanie biofilmu przez szczepy bakterii beztlenowych należących do gatunków znajdujących się w składzie mikrobioty jelitowej człowieka: *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*

Najaktywniej w działaniu antyadhezyjnym zaprezentowały się inulina, mannoza i rafinoza. Wykazano również, że inkubacja *C. difficile* z nieenterotoksynotwórczym szczepem *B. fragilis* jak i *B. thetaiotaomicron* znacząco hamowała zarówno adhezję oraz tworzeni biofilmu. Kombinacja szczepu *Bacteroides sp.* (potencjalny probiotyk) i fruktooligosacharyd (prebiotyk) wpływała korzystnie na hamowanie adhezji oraz tworzenie biofilmu wywołane ludzkim patogenem *C. difficile*.

Działanie prebiotyków mleka ludzkiego 3'-sialyllaktozy i 6'- sialyllaktozy na adhezję i tworzenie biofilmu przez *Clostridoides difficile* – badanie pilotażowe, to trzeci cykl eksperymentów omawianego doktoratu. Przedmiotem uwagi badacza była relacja między białkami ściany komórkowej cwp84 i

cwp66 C. difficile a oligosacharydami mleka ludzkiego – 3'-SL i 6'-SL. Stwierdzono hamujący, istotny statystycznie, wpływ oligosacharydów na adhezję *C. difficile* do wszystkich trzech badanych linii komórkowych. Badane prebiotyki hamowały ekspresję cwp84 przy braku znaczących zmian cwp66.

Zdjęcia przy użyciu skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego pozwoliły uwidocznić niedostrzegalne wcześniej różnice struktury biofilmu przy inkubacji *C. difficile* z oligosacharydami: 3'-SL stymulował powstawanie struktur o zmniejszonej gęstości, w przeciwieństwie do 6'-SL, gdzie powstawał gęsty biofilm z wyraźnie wydłużonymi komórkami *C. difficile*.

Są to pierwsze dane dotyczące wpływu oligosacharydów mleka ludzkiego ilustrujące wpływ *C. difficile* na procesy adhezji i tworzenie biofilmu.

Założenia i cel pracy to kolejny fragment omawianej pracy doktorskiej; Doktorant zaplanował:

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

A ponadto zaplanował:

1. Zbadanie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *Bacteroides sp.* w celu wybrania szczepu o najlepszych właściwościach pod tym względem 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 oligosacharydów mleka ludzkiego na ekspresję genów cwp84 i cwp66 kodujących białka biorące udział w adhezji *C. difficile*

Założenia i cel pracy omówiono dogłębnie, bardzo czytelnie i komunikatywnie, bardzo dobrze uzasadniono, wykazując tym samym doskonałą znajomość podejmowanego tematu .

Skrócony opis materiału i metod stanowi kolejny fragment recenzowanej pracy – przedstawiono dane wyczerpująco, zawierają istotne informacje, wskazują na doskonałe i krytyczne opanowanie nowoczesnego warsztatu naukowego.

Podsumowanie bardzo rzeczowe dotyczące istoty podjętych badań, wnioski w pełni zasadne. W bibliografii przedstawiono 48 starannie dobranych, aktualnych pozycji.

W ogólnej ocenie należy stwierdzić, iż przedstawiona rozprawa doktorska stanowi w dominującym stopniu samodzielny dorobek Doktoranta przygotowany spójnie i logicznie,

Doktorant kompetentnie porusza się wśród prezentowanych przez siebie zagadnień. Praca została wykonana prawidłowo, bardzo rzetelnie, przy wykorzystaniu nowoczesnych metod badawczych i z niezwykłą starannością, co dokumentuje odpowiednia punktacja.

W mojej opinii jako recenzenta, omawiana praca pt. „WPŁYW PREBIOTYKÓW NA ADHEZJĘ BAKTERII BEZTLENOWYCH DO LUDZKICH KOMÓREK JELITA GRUBEGO I BADANIE BIOFILMU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*" spełnia warunki wynikające ze stosownych przepisów dotyczących wymagań stawianych rozprawom na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Na tej podstawie mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o **przyjęcie** rozprawy i **dopuszczenie** do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Z racji ogromnego znaczenia poczynionych w pracy obserwacji, wysoce cennych i przydatnych dla kształtowania i opracowywania prozdrowotnych procedur, szczególnie w obszarze chorób jelitowych, jak również z racji oryginalnych, nieznanych wcześniej w piśmiennictwie światowym, obserwacji dotyczących mechanizmów patogenezy, wielce niepokojących epidemiologicznie zakażeń *C. difficile*, pozwalam sobie wnioskować o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Prof. dr. hab. n. med. Eugeniusz Małafiej
Specjalista mikrobiolog

Łódź dn. 09 czerwca 2022