



Warszawa, dn. 25.09.2023

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej

pt. „Zmiany składu mikrobiomu jelitowego, poziomu markerów endotoksyny i metabolitów bakteryjnych w przebiegu nowotworów u myszy”

Mikrobiota jelitowa to złożona społeczność mikroorganizmów zasiedlających jelita, która pełni bardzo wiele funkcji w organizmie. Badania nad mikrobiomem jelitowym ujawniły, że ma on istotny wpływ na wiele aspektów zdrowia, w tym na rozwój nowotworów. Znaczenie mikrobiomu jelitowego oraz czynników, które modulują jego skład (diety, infekcji, czynników środowiskowych, leków) w procesie karcynogenezy jest obszarem ciągłych badań, i choć istnieją obiecujące dowody na to, że mikrobiom odgrywa rolę w rozwoju nowotworów, to nadal potrzebne są dalsze badania, aby dokładnie zrozumieć mechanizmy tego wpływu i znaleźć konkretne strategie profilaktyczne i terapeutyczne. Dlatego uważam, że temat pracy podjęty przez Doktorantkę, dotyczący zmian składu mikrobiomu jelitowego, jego metabolitów i wybranych składowych w przebiegu eksperymentalnie wywołanych nowotworów u myszy jest ważny i aktualny.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest monografią charakteryzująca się typowym dla tego rodzaju prac układem. We wstępie Doktorantka uzasadnia motywację podjęcia pracy badawczej i na 34 stronach przeglądu piśmiennictwa przedstawia najnowsze badania dotyczące znaczenia mikrobioty jelitowej w utrzymaniu homeostazy organizmu i wpływu diety, w tym suplementów zawierających aktywne biologicznie biotyki na skład mikrobiomu jelitowego, a także opisuje proces tworzenia metabolitów mikrobioty (ze szczególnym uwzględnieniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA)) i ich

znaczenia w organizmie oraz znaczenie lipopolisacharydu (LPS) – składowej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych w aktywacji zapalnych procesów immunologicznych. Pokazuje również jak dysbioza jelitowa może wpływać na patogenezę nowotworów. Ze względu na fakt, że w części eksperymentalnej Doktorantka ocenia efekty zmian mikrobiomu na rozwój nowotworu prostaty i jelita grubego – tym dwóm stanom patologicznym poświęca najwięcej uwagi. Opisuje również metody oceny mikrobiomu jelitowego, SCFA i LPS.

Analiza tematu przedstawiona we wstępie skutkuje wysoką liczbą cytowanych pozycji piśmiennictwa (łącznie 279 pozycji) oraz pokazuje dużą dojrzałość Doktorantki w zrozumieniu skomplikowanych zależności pomiędzy bakteriami jelitowymi, ich metabolitami, składowymi oraz mechanizmami indukującymi procesy powstawania nowotworów.

Do tej części pracy mam następujące uwagi:

- 1) Doktorantka już na pierwszej stronie „Wprowadzenia” używa określeń lipopolisacharyd oraz krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które wielokrotnie pojawiają się w całej pracy, ale nie jest konsekwentna w stosowaniu skrótów, które sama podaje w nawiasach. Ciągłe powtarza całe określenia, często powtórnie ze skrótami w nawiasach, czasami tylko skróty. Należy zwrócić uwagę, że raz użyty skrót powinien być stosowany w całej pracy.
- 2) na stronie 15 Doktorantka pisze, że *„mikrobiota komunikuje się ze swoim gospodarzem za pomocą neuroprzekazników”*..... Oczywiście jest to prawda, ale jednocześnie należałoby zaznaczyć, że nie jest to jedyny mechanizm komunikacji i dotyczy głównie aktywacji osi mikrobiota-jelita-mózg. Całe spektrum różnych substancji i składowych mikrobioty bierze udział w komunikacji z gospodarzem, w tym między innymi przez aktywację komórek dendrytycznych.
- 3) na stronie 16 Doktorantka pisze, że mikrobiota jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania *„ układu odpornościowego na styku z układem pokarmowym”*..... Uważam, że Doktorantka powinna użyć określenia układu GALT, co tłumaczy się jako układ limfatyczny związany z przewodem pokarmowym
- 4) na stronie 18 i 19 Doktorantka opisuje biotyki (prebiotyki, probiotyki, postbiotyki i synbiotyki) jako czynniki modulujące mikrobiotę jelitową. Uważam, że Doktorantka powinna powołać się na najnowsze definicje opisywanych biotyków, które zostały opublikowane przez *International Scientific Association for*

Probiotics and Prebiotics (Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(8):506; Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(8):491; Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020;17(11):687; Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(9):649). Opublikowana w 2021 roku definicja postbiotyków podkreśla, że to nie tylko metabolity produkowane przez mikroorganizmy, ale również ich składowe np. ściany komórkowej. W kontekście tej nowej definicji LPS jest również postbiotykiem (Salminen et al. *The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021 Sep;18(9):649-667).

- 5) na stronie 40 Doktorantka pisze, że koncepcja korelacji rozwoju nowotworu z mikrobiotą jest „.....znana i stosowana.....” Uważam, że słowo „stosowana” jest niefortunnie użyte, gdyż nie wiem w jakim zakresie jest stosowana, a przede wszystkim jak?
- 6) na stronie 41 Doktorantka wymienia składniki dietetyczne, które wpływają na ryzyko rozwoju nowotworu prostaty. Szkoda, że nie wyjaśnia dokładnie, które z tych składników w jaki sposób wpływają (indukcja versus supresja).
- 7) na stronie 45 pojawia się określenie ...”flory bakteryjnej...” Uważam, że Doktorantka powinna użyć zamiast terminu „flory” określenia „mikrobiomu” lub „mikrobioty”.

Chciałabym jednak podkreślić, że drobne uwagi przedstawione powyżej nie wpływają na zawartość merytoryczną wstępu do rozprawy doktorskiej. Ta część pracy wymagała od Doktorantki ogromnej wiedzy interdyscyplinarnej (mikrobiologicznej, immunologicznej i medycznej) i pokazała jej wysoką zdolność analityczną.

Logicznym następstwem przeglądu piśmiennictwa zawartego we wstępie było wyznaczenie przez Doktorantkę celu głównego rozprawy doktorskiej: wykazanie interakcji SCFA i LPS oraz znaczenia diety wysokobłonnikowej dla tych interakcji w odniesieniu do zmian zachodzących w mikrobiocie jelitowej w przebiegu procesu nowotworowego u myszy.

Niezrozumiałym dla mnie jest wyjaśnienie Doktorantki w jaki sposób cel ten został zrealizowany (strona 52, akapit 2). W mojej ocenie jest to znaczny skrót myślowy i Doktorantka raczej powinna przedstawić cele szczegółowe rozprawy doktorskiej, czego

zabrakowało w tej części pracy, tym bardziej, że rozprawa składa się z dwóch etapów: w pierwszym wykorzystano model eksperymentalny nowotworu prostaty, w drugim model nowotworu jelita grubego.

Materiały użyte do badań oraz metody badawcze Doktorantka szczegółowo przedstawiła w rozdziale 4. Do tej części pracy nie mam większych uwag. Uważam, że zastosowane w pracy modele, materiał oraz metody zostały bardzo dokładnie opisane. Schemat badań został dodatkowo zobrazowany rycinami, które są bardzo pomocne w zrozumieniu procesu badawczego, natomiast warunki przeprowadzenia specyficznych analiz są dodatkowo przedstawione w licznych tabelach. Mnie zabrakowało w tej części pracy informacji pod rycinami i tabelami, czy jest to opracowanie własne. Wydaje mi się, że rycina 11 i 12 nie są rycinami oryginalnie stworzonymi przez Doktorantkę i należałoby podać pod każdą z nich źródło jej pochodzenia. Nie znalazłam też informacji dotyczącej użytych modeli nowotworu? Czy były one wcześniej opisane? Czy zostały oryginalnie stworzone przez Doktorantkę? Doktorantka nie napisała również, z której części jelita grubego myszy zostały pobrane próbki do badań (strona 63 i 64). Na stronie 73 Doktorantka opisuje uzyskane dane dla próbek wyjściowych i do opisu używa określeń w języku angielskim, co raczej nie powinno mieć miejsca.

Uzyskane wyniki badań Doktorantka zebrała i przedstawiła w Rozdziale 5. w postaci 49 rycin i 41 tabel. Mam pewne zastrzeżenia dotyczące prezentacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań. Doktorantka powinna przedstawiać swoje wyniki w postaci zbiorczych tabel lub rycin, natomiast w pracy pokazuje ona te same wyniki badań jako jednostkowe ryciny, potem tabele, a następnie jeszcze dodatkowo jako zbiorcze tabele/ryciny. Wystarczyłoby w zupełności pokazanie jednej zbiorczej tabeli lub ryciny. Uważam, że część wyników mogłaby Doktorantka zamieścić jako suplement tej pracy. Trudna do zrozumienia była też kolorystyka użyta przez Doktorantkę w tabelach. Nie została ona wyjaśniona i nie wiem czy poszczególne kolory i ich różne odcienie miały jakiegokolwiek znaczenie. Natomiast kolory bardzo przydałyby się do pokazania wyników pracy na rycinach, które z kolei były w kolorystyce czarno-białej, czasami trudnej do rozróżnienia. Uważam, że na rycinach, na których przedstawia korelację (relację) pomiędzy badanymi parametrami

powinien znaleźć się współczynnik korelacji (np. rycina 19, 38, 43, 61). W wielu tabelach podana jest tylko jedna cyfra bez zaznaczenia czy to mediana, czy średnia.

Do tej części pracy mam również inne drobne uwagi:

- na stronie 84 Doktorantka pisze, że.... „*tylko w grupie z silnie inwazyjnym nowotworem prostaty TRAMP-C2 wystąpiło przesunięcie równowagi mikrobioty*” i podaje w nawiasie (Rys. 19C). Wydaje mi się, że powinno być 19B.
- na stronie 85 w podsumowaniu wyników stwierdza, że „*szczególnie intensywne zmiany mikrobiomu zachodziły w środkowej fazie badań, gdy przyrost guzów prostaty był największy*”. Po pierwsze Doktorantka powinna sprecyzować co znaczy środkowa faza badań (między którymi dniami?), a po drugie Doktorantka nie pokazuje w swojej pracy w jaki sposób zmieniał się przyrost guza, chociaż w rozdziale poświęconym metodom opisuje, że u myszy oceniano stan zdrowia i wykonywano USG guza (strona 54 pracy). Podobne stwierdzenie znajduje się na stronie 100, na której Doktorantka podsumowując wyniki stwierdza, że „*podawanie paszy z wysoką zawartością alfa-celulozy miało większe znaczenie dla składu mikrobiomu jelitowego niż postępujący proces nowotworowy*” (jak oceniany?).
- na stronie 101 znajduje się rycina podsumowująca zmiany mikrobiomu jednak nie została ona opisana.
- na stronie 112 Doktorantka pisze, że zwiększona podaż alfa-celulozy obniża ilość bakterii Gram ujemnych ...”*w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego*” Uważam, że jest zbyt daleko idące określenie, gdyż Doktorantka nie analizowała zmian w zależności od miejsca pobrania kału. Myślę, że chodziło o jelito grube.

Moje uwagi dotyczące zarówno prezentacji wyników badań, jak i wyjaśnień ich opisu nie wpływają na pozytywną ocenę całego rozdziału. Analiza wyników jest wieloaspektowa i bardzo dokładna z wykorzystaniem najnowszych technik badawczych, co oceniam bardzo wysoko.

Rozprawę doktorską kończy dyskusja i wnioski. Uważam, że dyskusja dotycząca uzyskanych wyników powinna być podzielona na bardziej szczegółowe podrozdziały (nie tylko na podrozdział dotyczący nowotworu prostaty i nowotworu jelita grubego). Na stronie

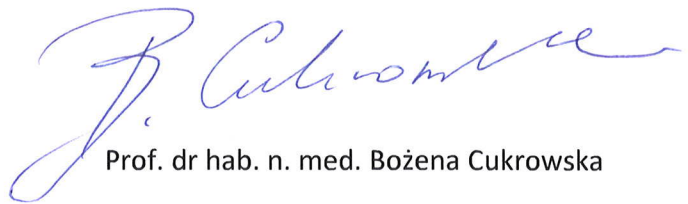
169 Doktorantka ponownie powtarza stwierdzenie, że wzrost poziomu SCFA obserwowano w okresie intensywnego wzrostu nowotworu (bez analizy przebiegu klinicznego nowotworu). Na stronie 178 Doktorantka opisuje wpływ SCFA na profil cytokinowy, przy czym opiera się tylko na danych literaturowych. W tej części zabrakowało mi dyskusji z wynikami uzyskanymi przez Doktorantkę. Dlatego moje pytanie dotyczy interpretacji uzyskanych wyników w zakresie poziomów cytokin w badanych modelach? Czy są one zgodne z tym co obserwowali inni badacze? Nie mogę się również zgodzić ze stwierdzeniem, że ... „*suplementacja SCFA jest przydatnym narzędziem w walce z nowotworem jelita grubego*” (strona 179). Raczej użyłabym stwierdzenia „*może być*”, gdyż obecnie nie ma żadnych rekomendacji do stosowania takiej terapii, pojawiają się pierwsze prace, że maślan może być używany w trakcie chemioterapii jako ochrona przed uszkodzeniem nabłonka jelitowego.

Pracę kończy 8 wniosków, które według mnie stanowią raczej podsumowanie uzyskanych wyników badań. Sugeruję, aby w końcowej publikacji uogólnić swoje obserwacje podając kilka najważniejszych wniosków, bez koncentrowania się na podawaniu szczegółowych wyników.

Kończąc swoją recenzję chciałabym podkreślić, że opis wyników badań oraz dyskusja wyników przeprowadzona przez Doktorantkę świadczy o dobrej znajomości problemów badawczych, umiejętności logicznego wykorzystania piśmiennictwa oraz krytycznego podejścia do danych literaturowych i własnych. Rozprawa doktorska stanowi kompleksową charakterystykę zmian mikrobiomu w trakcie rozwoju nowotworów litych prostaty i jelita grubego oraz wpływu diety na wielu poziomach – począwszy od oceny zmian składu mikrobiomu jelitowego poprzez ocenę poziomów SCFA i LPS, jak również receptorów dla tych postbiotyków i profilu cytokinowego. Wnikliwa analiza relacji pomiędzy badanymi parametrami pozwala na poznanie mechanizmów karcynogenezy związanych z dysbiozą jelitową, co może znaleźć praktyczne zastosowanie w leczeniu/profilaktyce chorób nowotworowych. Mam nadzieję, że w najbliższej przyszłości wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej będą publikowane w renomowanych czasopismach.

W podsumowaniu mojej recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska rozprawa pt. „*Zmiany składu mikrobiomu jelitowego, poziomu markerów endotoksyny i metabolitów*”

bakteryjnych w przebiegu nowotworów u myszy” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. 2017, poz. 1789). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska