Ocena rozprawy doktorskiej lek. stom. Roberta Kucharskiego pt.

„Znaczenie mikrobiomu jamy ustnej i mikrobiomu jelitowego w diagnostyce oraz leczeniu wybranych chorób przewodu pokarmowego"

Ocena wyboru tematu

Przez dziesięciolecia przewód pokarmowy postrzegany był niemal wyłącznie przez pryzmat funkcji motorycznych, wydzielniczych i absorpcyjnych. Jednak przełom w biologii molekularnej oraz rozwój technologii sekwencjonowania nowej generacji pozwoliły na odkrycie fascynującego ekosystemu - mikrobiomu, który na zawsze zmienił nasze rozumienie fizjologii człowieka. Mikrobiom jelitowy, składający się z bilionów mikroorganizmów, nie jest jedynie biernym pasażerem naszego ciała, lecz dynamicznym, metabolicznie czynnym „ukrytym organem", który współtworzy naszą homeostazę. Co więcej w kontekście chorób przewodu pokarmowego a zwłaszcza prewencji raka jelita grubego (RJG), mikrobiom przestaje być jedynie tłem, a wyniki badań wskazują, że staje się aktywnym celem interwencji medycznej. Obecnie strategie prewencyjne opierają się głównie na koncepcji modulacji mikrobiomu z udziałem pre i probiotyków, aby przekształcić go ze środowiska pro-kancerogennego w barierę ochronną. W tym kontekście wybór tematu do przeprowadzonych przez Doktoranta lek. Roberta Kucharskiego badań uważam za w pełni uzasadniony.

Celem pracy lek. Roberta Kucharskiego jest analiza tzw. profilu mikrobiomu jamy ustnej (ang. *oral microbiome signature*) i jelitowego (ang. *gut microbiome signature*) u chorych na RJG w okresie przed leczeniem operacyjnym. Jako cele szczegółowe przyjęto indentyfikację potencjalnych "onkobakterii" osi mikrobiom jamy ustnej – guz (rak jelita grubego) i mikrobiom jelitowy – guz (rak jelita grubego) oraz ocenę wpłwu 4-tygodniowej probiotykoterapii preparatem Sanprobi®Barrier na w/w mikrobiom. Doktorant uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (Uchwała nr KB/302/2023) wymaganą w prospektywnych projektach z interewncją medyczną. Rozprawa doktorska powstała pod opieką promotora Prof. dr hab. n. med. Leszka Kalinowskiego Kierownika Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry Analityki Klinicznej GUMed.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje 64 strony maszynopisu, z tradycyjnym podziałem na wstęp, cel pracy, metodykę badań, wyniki, dyskusję i wnioski oraz wykaz stosowanych skrótów. Zawiera 80 pozycji piśmiennictwa, 5 tabel, 3 ryciny, 16 wykresów, streszczenie w języku polskim i angielskim.

Ocena merytoryczna

We wstępie Autor omawia zagadnienia związane z mikrobiomem jelitowym i zaburzeniem jego funkcji w przebiegu wybranych chorób przewodu pokarmowego, takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniowskiego-Crohna i rak jelita grubego. Obszerne fragmenty są poświęcone zagadnieniom z zakresu diagnostyki i modulacji mikrobiomu w celu przywrócenia homeostazy i eubiozy. Ta część pracy wskazuje na dużą znajomość tematu oraz dobre przygotowanie Doktoranta do podjęcia własnych badań.

W rozdziale Metody założenia projektu, kryteria włączenia i wyłączenia z badania oraz techniki laboratoryjne zostały prawidłowo opisane. Rekrutację chorych do badania przeprowadzono w Oddziale Chirurgii Ogólnej z Pododdziałem Chirurgii Onkologicznej Szpitala Specjalistycznego w Kościerzynie. W wyniku randomizacji chorych podzielono na 2 grupy tj. otrzymujących probiotyk Sanprobi®Barrier jako preparat wieloszczepowy (*Bifidobacterium lactis* W52, *Levilactobacillus brevis* W63, *Lacticaseibacillus casei* W56, *Lactococcus lactis* W19, *Lactococcus lactis* W58, *Lactobacillus acidophilus* W37, *Bifidobacterium bifidum* W23, *Bifidobacterium lactis* W51, *Ligilactobacillus salivarius* W24) 2 kapsułki dziennie (1 kapsułka: 5 x 10 8 CFU/ AFU PN-ISO 19344) przez 4 tygodnie lub placebo. U każdego chorego przeprowadzono ocenę stanu jamy ustnej, pobrano dwukrotnie (dzień 0 i 28) wymaz z jamy ustnej wymazówkami DNA/RNA Shield SafeCollect Swab Collection Kit Zymo Research. Podobnie, próbki kału przynajmniej 4 g, które umieszczono w DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube Zymo Research. Do czasu analizy laboratoryjnej materiał był przechowywany w temperaturze -80° C w Biobanku Fahrenheit'a BBMRI.pl GUMed. Badania wykonano na Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie korzystając z metody 16S rRNA V1-V9 oraz dodatkowo shallow shotgun w przypadku mikrobiomu jamy ustnej. W celu oznaczenia mikrobiomu dokonano izolacji DNA, odpowiednio przygotowano biblioteki oraz przeprowadzono sekwencjonowanie i analizę bioinformatyczną. W opinii recenzentki zastosowanie nowoczesnych metod sekwencjonowania 16S rRNA obejmujących regiony V1–V9 (podczas gdy standardem jest zazwyczaj węższy zakres V3-V4) oraz metody *shallow shotgun* dla mikrobiomu jamy ustnej stanowi najbardziej wartościowy element niniejszej rozprawy.

W wynikach charakterystyka chorych jest dość ogólna, co istotne w tabeli 3 brak informacji o ogólnej liczbie włączonych chorych, jak i w poszczególnych ramionach badania. Co więcej w kolejnych przedstawionych analizach trudno zorientować się co do liczby wykonanych procedur w poszczególnych grupach (z interwencją vs placebo). Niestety nie ułatwiają tego załączone wykresy (od 7 do 15). Próbki o niewystarczającej głębokości sekwencjonowania wykluczono przed dalszą analizą, aby zapewnić porównywalność między grupami. Ile było wykluczonych próbek? Niektóre przedstawione wyniki wymagają wyjaśnienia np. jeżeli profil mikorbiomu jelitowego wykonano u każdego chorego włączonego do badania, to dlaczego w tabeli 5 przedstawiono ogólną taksonomię na podstawie wybranych próbek 01-07. Kluczowym osiągnięciem niniejszej pracy jest wykazanie, że 4-

tygodniowa suplementacja wieloszczepowym probiotykiem nie zmienia struktury ekosystemu (stabilna różnorodność alfa i beta), co świadczy o bezpieczeństwie i braku „gwałtownego" wpływu na homeostazę dorosłego człowieka. Aczkolwiek zastosowanie probiotyku poprzez selektywną modulację taksonów, zwiększa liczebność korzystnych bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs), takich jak *Faecalibacterium, Subdoligranulum, Agathobacter* i *Fusicatenibacter*, a jdnocześnie redukuje taksony potencjalnie prozapalne i patogenne, m.in. *Escherichia-Shigella, Desulfovibrio* oraz *Haemophilus*. Warto docenić krytyczne podejście Doktoranta do uzyskanych wyników dotyczących mikrobiomu jamy ustnej. Pomimo zastosowania najlepszych praktyk klinicznych, wysoka zawartość ludzkiego DNA i niska liczba odczytów bakteryjnych uniemożliwiły jednoznaczną charakterystykę profilu mikrobiomu jamu ustnej. W pracy szczegółowo przeanalizowano potencjalne przyczyny, wskazując na szereg możliwych czynników takich jak warunki przechowywania materiału czy przestrzeganie zaleceń przed pobraniem materiału przez chorych. Dyskusja jest poprowadzona prawidłowo. Doktorant omawia wyniki swoich badań w kontekście danych z piśmiennictwa. Nie uniknął jednak niepotrzebnych powtórzeń przytaczając informację wcześniej ujęte w opisie metod i wynikach. Doktorant podkreśla, że uzyskane wyniki należy interpretować z ostrożnością z uwagi na małą grupę chorych, niemniej jednak stwarzają one przesłanki do dalszych badań. Wnioski są sformułowane prawidłowo. Doktorant w niniejszej rozprawie wykazał, że u chorych na RJG profil mikrobiomu jelitowego kwalifikowanych do leczenia radykalnego jest zdominowany przez bakterie z gromad *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* a zastosowanie probiotykoterapii w okresie przedoperacyjnym jest uzasadniona, gdyż promuje wzrost taksonów bakterii o potencjale przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym.

Ocena piśmiennictwa i poprawności językowej

Całość pracy opatrzona jest 80 pozycjami piśmiennictwa, z których zdecydowana większość została opublikowana w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach. W dużej części są to prace opublikowane w ostatnim dzisięcioleciu. Dysertacja jest napisana poprawnym językiem z wykorzystaniem prawidłowej stylistyki i terminologii.

Uwagi inne

1. Tytuł pracy. Praca dotyczy wyłącznie chorych na raka jelita grubego, a nie wybranych chorób przewodu pokarmowego.
2. Cytowania. Należy cytować prace oryginalne dotyczące danego zagadnienia np. opornośc na 5-fluorouracyl i oksaliplatynę związane z *F. nucleatum* to W miejsce pracy 25 prawidłowe cytowanie: Yu T, Guo F, Yu Y, i wsp. Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. Cell. 2017
3. W wykazie skrótów widoczny jest brak konsekwencji w zakresie rozwinięć w języku polskim i angielskim. Skróty powinny być rozwinięte w obu językach, bowiem zdecydowana większość

powstaje w oparciu o nazwy angielskie, ale dysertacja jest napisana w języku polskim. Uwagi językowe i edytorskie często odbierane są jako niepotrzebne i nadmierne, jednak pracę doktorską powinna cechować szczególna staranność. Te uwagi nie wpływają, oczywiście, na wartość merytoryczną dzieła i końcową całościową pozytywną ocenę dysertacji.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. stom. Roberta Kucharskiego dotyczy ważnego zagadnienia naukowego jakim jest mikrobiom jelitowy u chorych na RJG i wpływu probiotyków na jego modulację. Niniejsza praca spełnia kryteriom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych określonych w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571. Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku z wnioskiem o dopuszczenie lek. stom. Roberta Kucharskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Renata Duchnowska

Warszawa, 29.04.2026 r.