



dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska  
Zakład Dietetyki i Żywienia Klinicznego  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
15-054 Białystok  
ul. Mieszka I-go 4B  
tel./fax 85 732 82 44

Białystok, dn. 10.05.2019

### **Recenzja pracy doktorskiej**

**mgr. inż Agaty Janczy pt. „Wpływ diety redukcyjnej i suplementacji probiotyku na mikrobiom i przepuszczalność jelit u osób z nadwagą i otyłością”**

Otyłość jest chorobą przewlekłą bez tendencji do samoistnego ustępowania. Nadwaga jest stanem przedotyłościowym, gdzie skuteczna profilaktyka może uchronić przed wystąpieniem choroby i jej następstw. Otyłość jest powodem wielu zaburzeń metabolicznych takich jak: insulinooporność, zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz chorób towarzyszących, m.in. nadciśnienia tętniczego, cukrzycy typu 2, dny moczanowej, kamicy żółciowej, miażdżycy i jej powikłań, oraz niektórych nowotworów. Przyczyn otyłości możemy szukać wśród czynników środowiskowych, psychologicznych, metabolicznych i genetycznych. Coraz częściej w patogenezie nadmiernego gromadzenia tkanki tłuszczowej w ustroju i jej stanu zapalnego wymienia się udział mikrobiomu gospodarza. Wiadomym już jest, że ekosystem bakterii jelitowych jest bardzo indywidualny, jednak zdecydowanie mniej zróżnicowany u osób otyłych niż z prawidłową masą ciała. W stanie dysbiozy bakterie patogenne mogą powodować pogorszenie pracy bariery jelitowej, endotoksemię ustrojową, zwiększyć pozyskiwanie energii z pożywienia (dzięki zdolności do rozkładania niestrawialnych polisacharydów i zwiększonego wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów

Dziekanat Wydziału Nauk o Zdrowiu

Wpl. dnia.....1.6 MAJ 2019.....

Nr-DNZ/.....137-2019.....

tłuszczowych) i w ten sposób przyczyniać się do gromadzenia tkanki tłuszczowej i niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Badania wykazują, że mechanizmem dzięki któremu mikrobiota jelitowa sprzyja magazynowaniu tłuszczu w adipocytach może być hamowanie ekspresji genu kodującego czynnik tkankowy indukowany głodem (FIAF). Tak więc, modyfikacja składu mikrobiomu jelitowego poprzez dietoterapię i probiotykoterapię wydaje się być obiecującą strategią wspomagającą obniżenie ryzyka występowania nadwagi czy otyłości, a jednocześnie elementem wspierającym wieloletnią terapię choroby przewlekłej jaką jest otyłość.

Praca ma typowy układ dla pracy doktorskiej, składa się z pięciu rozdziałów, piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu tabel, schematów i wykresów, aneksu pracy (zawierającego analizę częstości spożycia na podstawie kwestionariusza FFQ-6, przykład jadłospisu 14-dniowego w diecie 1400 kcal). Przedstawiona jest na 128 stronach, posiada 37 tabel, jeden schemat i 16 wykresów.

We wstępie Doktorantka przedstawia podstawy teoretyczne przeprowadzonych badań. Dotyczą one charakterystyki choroby, jaką jest otyłość, jej epidemiologię, klinikę oraz związek z mikrobiotą jelitową. Doktorantka opisuje funkcje mikrobiomu w organizmie człowieka oraz metody oceny ekosystemu jelitowego. Podkreśla współdziałanie mikrobioty z komórkami układu immunologicznego, z utrzymaniem integralności nabłonka jelit. Funkcja immunologiczna bakterii jelitowych dotyczy również eliminacji szkodliwych antygenów i produkcji mediatorów stanu zapalnego. Wiele wyników badań wskazuje, że zakłócenie homeostazy mikrobiomu jelitowego zwiększa przepuszczalność bariery jelitowej, co w obrazie klinicznym może manifestować się zaburzeniami metabolicznymi, autoimmunologicznymi i neurorozwojowymi. Poza tym coraz więcej mamy dowodów naukowych na to, że zmiany w mikrobiomie jelitowym mogą wpływać na ogólnoustrojowy stan zapalny, w tym stan zapalny toczący się w wisceralnej tkance tłuszczowej, zmiany sekrecji adipocytokin, co może mieć wpływ na zwiększenie oporności tkanek na insulinę. Poza tym lipopolisacharydowe osłonki bakterii gram ujemnych oraz wytwarzane przez bakterie jelitowe krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe SCFA mogą uruchomić wiele procesów, mających negatywny wpływ na metabolizm człowieka, np. wpływać na wydzielanie peptydu PYY (który spowalnia pasaż treści jelitowej i ułatwia pobieranie energii), czy stymulować aktywność lipazy lipoproteinowej (co sprzyja magazynowaniu tkanki tłuszczowej) i inne. Natomiast modyfikacja składu mikrobiomu jelitowego poprzez dietoterapię wydaje się być obiecującą strategią, wspomagającą obniżenie ryzyka nadwagi i zachorowania na otyłość. Kolejnym tematem omówionym przez Doktorantkę we wstępie jest

charakterystyka zonuliny jako markera stabilności bariery jelitowej oraz laktoferyny jako markera stanu zapalnego.

Wstęp jest dobrym wprowadzeniem do celu pracy. Mgr inż. Agata Janczy podjęła się, oceny występowania stanu zapalnego, przepuszczalności jelit oraz zmian liczebności wybranych rodzajów bakterii i grzybów w kale pacjentów zakwalifikowanych do leczenia dietetycznego nadwagi i otyłości oraz oceny wpływu probiotyku na skład mikrobiomu jelit u osób poddawanych redukcji masy ciała. Jej hipoteza badawcza opierała się na założeniu, że u osób z podwyższonym BMI obecny jest przewlekły, subkliniczny stan zapalny w obrębie jelit, zwiększona przepuszczalność jelitowa oraz nieprawidłowy skład mikrobiomu jelitowego. Natomiast zastosowanie diety opartej o rekomendacje Polskiego Towarzystwa Dietetyki (PTD) oraz podaż probiotyku wpływa korzystnie na skład mikrobiomu jelit oraz skuteczność redukcji masy ciała.

Doktorantka przeprowadziła badanie wśród 56 pacjentów z nadwagą lub otyłością (44 kobiety i 12 mężczyzn), zgłaszających się w celu redukcji masy ciała do Poradni Dietetycznej, Katedry Żywienia Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Ograniczeniem pracy była rezygnacja z badania 3 pacjentów oraz 19 kolejnych, którzy nie dostarczyli do badania drugiej próbki kału. Badanie miało charakter pojedynczej próby zaślepionej z zastosowaniem randomizacji losowej do grupy badanej (z probiotykiem) i kontrolnej (otrzymującej placebo). Ostatecznie badanie ukończyło 25 osób z grupy Probiotyk i tylko 12 osób z grupy Placebo.

W trakcie pierwszej wizyty odbywała się kwalifikacja (zgodnie z przyjętymi kryteriami włączenia) oraz przydzielenie pacjentów do grup. Prawdopodobnie w trakcie tej wizyty (lub na wizycie drugiej?) zbierano wywiad żywieniowy, wykonano pomiary antropometryczne, ustalono schemat postępowania dietetycznego, wypełniono kwestionariusz częstości spożycia FFQ. W trakcie wizyty drugiej wszystkie osoby dostarczyły dwie próbki kału do oznaczeń mikrobiologicznych oraz do późniejszego oznaczenia zonuliny i laktoferyny, a następnie objaśniono im postępowanie dietetyczne (indywidualną dietę redukcyjną). Grupa placebo (n=20) miała zlecone przyjmowanie 2 tabletek dziennie, podobnie jak część grupy badanej Probiotyk (n=20 - 2 tabletki z probiotykiem), a 16 osób z tej grupy – miało przyjmować 4 tabletki z probiotykiem dziennie (czego jednak nie uwzględniono w ostatecznej analizie wyników, z powodu finalnie małej liczebności podgrupy – czyli jakiej? – jest to dla mnie niezrozumiałe gdyż 16 osób już można poddawać analizom statystycznym) i połączono grupę Probiotyk przyjmującą 2 lub 4 tabletki z probiotykiem dziennie (co budzi moje zastrzeżenie, po pierwsze ma różne możliwości wpływu dwóch

różnych stężeń bakterii probiotycznych oraz sugestii badanym osobom, kto nie jest w grupie placebo, bo przyjmuje więcej tabletek – a wtedy nie jest to już pojedyczno zaślepiona próba). Następnie wszyscy uczestnicy badania odbywali 6 spotkań kontrolnych, co 2 tygodnie (analizowano przestrzeganie diety i ilość zużytych tabletek Placebo lub Probiotyku). W trakcie szóstego spotkania kontrolnego pacjenci przynieśli drugie próbki kału do badań mikrobiologicznych i końcowych oznaczeń zonuliny i laktoferyny (ile więc było ostatecznie ocenianych prób?). Suplementacja symbiotykiem Sanprobi Super Formula (firmy Sanprobi Sp. z o. o. zawierającym siedem żywych szczepów bakterii probiotycznych oraz dwa prebiotyki) trwała 12 tygodni. Obie badane grupy były dobrze dobrane pod względem wieku i BMI (brak różnic istotnych statystycznie). Badanie mikrobiologiczne próbki kału wykonano dwukrotnie z użyciem testu KyberKompakt w laboratorium Instytutu Mikroekologii w Poznaniu. Dla oceny ewentualnych korelacji pomiędzy stanem jelit pacjentów, a liczebnością drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym, bakterie przedstawione w wynikach posiewów podzielono na trzy grupy w zależności od pełnionych przez nie funkcji w organizmie (mikroflora ochronna, mikrobiota immunostymulująca, mikrobiota proteolityczna). Stężenie zonuliny w kale oznaczano przy użyciu testu zonulin ELISA Immundiagnostik AG, Germany, a stężenie laktoferyny w kale przy użyciu testu Lactoferrin ELISA Immundiagnostik AG, Germany. Do analizy wyników użyto właściwie dobranych metod statystycznych.

Doktorantka uzyskane wyniki przedstawiła w sposób czytelny na 52 stronach i w aneksie pracy. Ponieważ kryterium włączenia do badania było  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , to należałoby przedstawić ile osób w każdej z grup miało nadwagę, a ile otyłość (zakres BMI wahał się bowiem od 25,1 – 56,4  $\text{kg/m}^2$ ), a jest to istotne w tak małej badanej grupie, gdyż osoby z BMI bliskim 25  $\text{kg/m}^2$  mogły mieć skład bakterii jelitowych zbliżony do osób z prawidłową masą ciała. Doktorantka skupiła się jednak na fakcie, że średnie BMI w obu badanych grupach nie różniło się istotnie statystycznie i wskazywało na otyłość. Moje kolejne pytanie do Doktorantki brzmi – ile ostatecznie było analizowanych osób z grupy Placebo  $n=20$  czy  $n=12$ ? oraz ile z grupy Probiotyk  $n=36$ , czy  $n=25$ ?). Czy pierwsze i drugie próbki kału były analizowane u tych samych osób na początku i na końcu eksperymentu, czy dla innej liczebności - pierwsze próbki kału ( $n=56$ ), a dla innej – drugie próbki ( $n=37$ )? (jak to się ma do schematu przebiegu badania przedstawionego na str. 27. Nie ma też w pracy charakterystyki grupy końcowej).

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w częstości spożycia wybranych produktów spożywczych w obu badanych grupach przed rozpoczęciem niniejszego badania (mogłoby to korzystnie wskazywać, że czynnik żywieniowy w obu grupach osób z nadwagą

i/lub otyłych nie był czynnikiem zakłócającym badanie, pod warunkiem, że nie uległ zmianie w trakcie eksperymentu). Analizie poddano zmiany BMI przed oraz po interwencji żywieniowej i podawanym placebo/probiotyku. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami ani przed ani po wykonanym eksperymencie. Natomiast wykazano istotny statystycznie spadek BMI w obu grupach po 12 tygodniach. Analiza *post hoc* (Dunna test) w obu badanych grupach wykazała istotny spadek masy ciała w 10 i 12 tygodniu diety w stosunku do wyjściowej masy ciała oraz istotny spadek masy ciała w tygodniu 12 w stosunku do 2 tygodnia terapii (czy były to analizy tylko grupy n=37?). Natomiast charakterystyka porównawcza badanych grup pod względem zawartości tkanki tłuszczowej, beztłuszczowej masy ciała, wody i podstawowej przemiany materii nie wykazała istotnych statystycznie różnic w obu badanych grupach. Budzi jednak moje zastrzeżenia dokładność pomiaru sprzętu użytego do tego badania (np. duże obniżenie beztłuszczowej masy ciała w grupie Placebo w 2 tygodniu do 54,3 (10,8) kg i wzrost do 62,7 (19,6) kg w 4 tygodniu, po czym ponowny spadek w 6 tygodniu i wzrost w 8 tygodniu itd., co też miało wpływ na BMR w tej grupie). Ostatecznie wykazano, że masa tkanki tłuszczowej w grupie pacjentów stosujących probiotyk istotnie zmniejszyła się w 12 tygodniu w stosunku do masy tkanki tłuszczowej wyjściowej, a w grupie Placebo - istotnie zmniejszyła się w 12 tygodniu w stosunku do masy tkanki tłuszczowej wyjściowej oraz istotnie zmniejszyła się w 12 tygodniu w stosunku do masy tkanki tłuszczowej w 2 tygodniu diety. Oceniając stężenie markerów stanu zapalnego i przepuszczalności jelit w badanych grupach Doktorantka wykazała brak istotnych statystycznie zmian w stężeniach zonuliny i laktoferyny w kale zarówno przed jak i po obserwacji (czy dotyczyły one tych samych osób?). Obserwowała jednak obniżenie stężenia badanych markerów w grupie przyjmującej probiotyk, natomiast wzrost zonuliny i laktoferyny w grupie przyjmującej placebo. Nie obserwowano związku stężenia zonuliny i laktoferyny w próbkach kału z wiekiem ani BMI wyjściowym czy końcowym.

Doktorantka podjęła się również analizy mikrobiologicznej próbek kału. Analiza statystyczna zmian liczebności bakterii w posiewie 1, pełniących funkcje ochronne w przewodzie pokarmowym nie wykazała istotnych statystycznie różnic w liczebności poszczególnych drobnoustrojów, natomiast w posiewie 2, zaobserwowano, że liczebność bakterii *Bacteroides spp.* w grupie Placebo była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie Probiotyk. Porównanie wyników otrzymanych z badania bakteriologicznego wykonanego przed i po 12 tygodniach nie wykazała istotnych różnic w obu badanych grupach pod względem liczebności bakterii pełniących funkcje immunostymulujące ani pod względem liczebności bakterii należących do grupy proteolitycznych. Nie wykazano też różnic w

proporcjach bakterii *Firmicutes* do *Bacteroides*, ani istotnych statystycznie zależności liczebności grzybów drożdżopodobnych *Candida albicans* ani drożdżaków ogółem w obu badanych grupach. W tabelach prezentowane są istotności i różnice między grupą Probiotyk i grupą Placebo, ale chętnie dowiedziałabym się o istotności różnic w obrębie poszczególnych grup przed i po interwencji.. np. co do każdej badanej bakterii wskaźnikowej w posiewie 1 i w posiewie 2 w grupie Probiotyk u tych samych osób?

Doktorantka po zakończeniu obserwacji wykazała ujemną korelację pomiędzy stężeniem zonuliny w kale, a liczebnością bakterii z rodzaju *Bacteroides* oraz bakterii pełniących funkcje ochronne w grupie Placebo, natomiast w grupie Probiotyk – stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem zonuliny w kale, a liczbą bakterii *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* oraz grupy bakterii pełniących funkcję immunostymulującą. Doktorantka zwróciła uwagę na fakt, że w grupie Placebo przed przystąpieniem do badania stężenie zonuliny w próbkach kału pacjentów było istotnie statystycznie wyższe u osób, które następnie redukowały masę ciała więcej niż 5,5 kg. W grupie Probiotyk, po zakończeniu badania stężenie zonuliny było istotnie niższe u pacjentów redukujących powyżej 5,5 kg masy ciała, co mogłoby sugerować, że większy ubytek masy ciała oraz ewentualna probiotykoterapia wpływają na poprawę pracy bariery jelitowej. Oceniając związek stężenia laktoferyny w próbkach kału z oznaczanymi bakteriami jelitowymi Doktorantka stwierdziła w grupie Placebo, iż wraz ze wzrostem stężenia laktoferyny rosła liczebność bakterii *Lactobacillus spp.* i *Clostridium spp.* oraz grupy bakterii proteolitycznych. W grupie Probiotyk nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji. Rozdział Wyniki zakończony jest bardzo wartościowym podsumowaniem, co ułatwia zebranie wyników i wnioskowanie.

Dyskusja uzyskanych wyników przeprowadzona jest rzeczowo, w oparciu o dobrą znajomość literatury tematu na 11 stronach. Z pozycji recenzenta zabrakło mi w tej dyskusji najnowszych metaanaliz dotyczących wpływu długoterminowej probiotykoterapii na redukcję masy ciała, z których wynika, że bakterie probiotyczne nie wpływają znacząco na zmniejszenie masy ciała, ale na zmniejszenie stanu zapalnego w ustroju oraz poprawiają parametry metaboliczne tj. insulinowrażliwość, glikemię na czczo, lipidogram oraz przyczyniają się do zmniejszenia tłuszczowej niealkoholowej choroby wątroby. Przy publikowaniu pracy sugerowałabym też usunięcie z piśmiennictwa prac poglądowych i zmianę cytowań na prace oryginalne.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 5 wniosków końcowych, podsumowujących uzyskane wyniki. Uzasadniają one postawione cele badania, chociaż nie zawsze są adekwatne z przedstawionymi wynikami (widzę rozbieżności np.

między wnioskiem 1 a podsumowaniem na str. 68 punkt 6 i 7). Poza tym może warto we wnioskach zaznaczyć, że stężenie zonuliny w grupie Probiotyk obniżyło się po eksperymencie, a w grupie Placebo zwiększyło się (pod warunkiem, że analizowano tyle samo osób przed i po interwencji), podobnie jak stężenie laktoferyny (obniżyło się w grupie Probiotyk i podwyższyło się w grupie Placebo).

Z pozycji Recenzenta uważam, że tematyka badań, jaką podjęła się Doktorantka jest ciekawa, bo dotyczy bardzo ważnego tematu jakim jest wpływ mikrobioty na pracę bariery jelitowej, bądź jej zwiększoną przepuszczalność, integrację z systemem immunologicznym i procesami metabolicznymi toczącymi się w ustroju gospodarza. Gratuluję Pani Promotor i Doktorantce wyboru tego tematu. Bardzo cenne jest przedstawienie nie tylko redukcji masy ciała po zastosowanej kontrolowanej dietoterapii przez 12 tygodni, ale również analiza składu jelitowych bakterii wskaźnikowych w próbkach kału przed eksperymentem oraz po interwencji dietetycznej i probiotykoterapii z podziałem tych bakterii na mikrobiotę ochronną, immunostymulującą i proteolityczną, z indentyfikacją grzybów drożdżopodobnych i grzybów pleśniowych oraz jednoczesnym monitorowaniem markera stanu zapalnego – laktoferyny w próbkach kału oraz markera stabilności bariery jelitowej – zonuliny w próbkach kału. Moim zdaniem najwartościowszą częścią tej dysertacji są korelacje pomiędzy mikrobiomem jelit a zonuliną i laktoferyną oraz parametrami antropometrycznymi.

Praca jest napisana bardzo starannie, piękną polszczyzną, (choć doktorantka nie ustrzegła się błędów literowych, co nie umniejsza wartości przedstawionej mi do recenzji pracy). Praca ta ma walory poznawcze i implikacje kliniczne. Co prawda wnioskowanie jest zbyt odważne w stosunku do liczebności badanych grup (12 osób bez probiotyku i 25 osób z probiotykiem – z różnym stężeniem bakterii probiotycznych).

Uważam, że praca odpowiada wymogom stawianym tego typu pracom doktorskim. Pokreślenia wymaga bardzo dokładne przeanalizowanie tematu, sprawdzenie wszystkich postawionych hipotez oraz umiejętność opracowania statystycznego uzyskanych wyników. Dlatego też, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Agaty Janczy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska

10.05.2019