

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. med. Karola Kowalskiego na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne, pt. "Zaburzenia Mikrobioty jelitowej w chorobie Alzheimera". Praca została wykonana w Katedrze i Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem Promotora Pani Dr hab. n. med. Agaty Mulak, Profesora Nadzwyczajnego

Przedstawiona do oceny praca doktorska Lekarza medycyny Karola Kowalskiego jest opracowaniem monograficznym, które powstało w Katedrze i Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem Promotora Pani Doc. Agaty Mulak. Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy bardzo aktualnego tematu jakim są zmiany w mikrobiocie jelitowej u chorych cierpiących na chorobę Alzheimera. Praca, której zasadnicze cele oraz przybliżenie wyników i dyskusja są przedstawione jasnym i zrozumiałym językiem, jest w całości starannie przygotowana pod względem naukowym oraz graficznym w oparciu o aktualne piśmiennictwo zwłaszcza zagranicznych autorów, odpowiadające zagadnieniom stanowiącym treść rozprawy. Co istotne i warte podkreślenia, Doktorant przytacza również piśmiennictwo krajowych gastroenterologów, w tym znamienitych członków Polskiego Towarzystwa Gastroenterologicznego, co dodatkowo podkreśla i wzmacnia udział naszych krajowych specjalistów w aktualnych bieżących zagadnieniach współczesnej gastroenterologii. Sama edycja pracy świadczy o nabytym już dużym doświadczeniu Autora z zakresu przede wszystkim z chorób wewnętrznych, w tym w klinicznej gastroenterologii, ale również zagadnień z neurofizjologii i chorób neurologicznych. Praca liczy w sumie 113 stron i charakteryzuje się klasycznym układem typowym dla tego typu prac, z podziałem na wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i streszczenie. Liczba pozycji piśmiennictwa liczy 203 pozycje bezpośrednio powiązanego z tematem tej rozprawy.

Temat ocenianej rozprawy na stopień doktora nauk medycznych, dotyczy bardzo aktualnych zagadnień jakimi są powiązanie choroby Alzheimera (AD) a powikłaniami ze strony przewodu pokarmowego. AD jest dziś najczęstszą przyczyną demencji i charakteryzuje się postępującym deficytem funkcji poznawczych, ubóstwem podstawowych funkcji życiowych,

obniżając w sposób szczególny, jakość życia chorych cierpiących na to schorzenie. Patomechanizm choroby AD przypisywany jest głównie odkładaniu się amyloidu B w formie blaszek amyloidowych i nadekspresji białka tau. Prowadzi to do w konsekwencji do zapalenia w zakresie ośrodkowego układu nerwowego, utraty czynnych połączeń synaptycznych i śmierci neuronów w skutek m. in. nasilonej apoptozy. Hipotezę amyloidową Autor tłumaczy poprzez proteolizę do glikoproteiny APP, prowadzącą do powstania peptydów, w tym A β 40 i 42, które agregują w oligomery, fibryle, następnie tworzące blaszkę amyloidową. Doktorant stwierdza, że oligomery A β są postrzegane jako najbardziej toksyczne formy amyloidów. Mechanizm amyloidu β w patogenezie AD nie jest do końca poznany i wciąż poszukuje się czynników i mechanizmów pośrednich odpowiedzialnych za inicjację jego agregacji. Autor stwierdza, w dalszym ciągu świetnie zredagowanego Wstępu, że nie ma skutecznego leczenia dla chorych z AD, a farmakoterapia ma charakter typowo objawowy, co więcej, jej celem jest ograniczenie zaburzeń w zakresie funkcji poznawczych i otępienia. Jeśli chodzi o leczenie farmakologiczne, to zgodnie z przytoczoną hipotezą cholinergiczną w leczeniu AD stosuje się inhibitory acetylocholinesterazy (AChE), co przekłada się na zwiększona biodostępność Ach w działaniu na receptory nikotynowe (N) i muskarynowe (M) zarówno w CSN jak i na obwodzie. W klasycznym leczeniu stosuje się też statyny, które obniżają poziom cholesterolu, ograniczające działanie białka *tau*, oraz usuwanie A β z mózgu. Dlatego w opinii Doktoranta, żadna z tych metod i hipotez nie daje możliwości wyleczenia i dlatego poszukuje się nowych alternatywnych możliwości terapeutycznych. Zgodnie z głównymi celami pracy, Autor przechodzi w dalszym ciągu swojej dysertacji do omówienia udziału mikrobioty jelitowej i jej pośrednictwa w dwukierunkowego powiązaniu jelit z ośrodkowym układem nerwowym (OUN). Na charakter tych zmian ma przede wszystkim wpływ skład i zróżnicowanie mikrobioty jelitowej. Istotnym jest, że bakterie jelitowe produkują znaczną ilość amyloidu, który pomimo innej sekwencji aminokwasów jest w swojej strukturze trzeciorzędowej podobny do amyloidu produkowanego w OUN. Poprzez mechanizm mimikry molekularnej bakteryjne amyloidy, na podobieństwo białek prionowych, mogą indukować nieprawidłowe fałdowanie własnych amyloidów umożliwiając ich agregację i formowanie blaszek amyloidowych. Niestety starość osobnicza prowadzi do rozszczelnienia bariery krew-mózg prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalności dla samych bakterii jelitowych, bakteryjnych endotoksyn (np. LPS) i czynników zapalnych, szczególnie w okolicy hipokampa, który jest ośrodkiem odpowiedzialnym za tzw. mechanizm pamięci świeżej i w związku z tym ma wpływ również na proces uczenia się. W tym procesie nie można też

pominać nad-reakcji jaką jest nadmierna odpowiedź ze strony układu immunologicznego, przez co dochodzi do indukcji przewlekłego stanu zapalnego w układzie nerwowym, obserwowanego zwłaszcza u osób w podeszłym wieku.

Przytoczone przez Autora wyniki badań na modelach zwierzęcych i obserwacje kliniczne jednoznacznie wskazują na udział mikrobioty jelitowej, która u człowieka osiąga znaczącą wagę (aż ~1.5 kg), w patomechanizmie AD, chociaż brakuje dokładnych danych badawczych świadczących o tym bezpośrednim związku, zwłaszcza w chorobach neurozwyrodnieniowych, do których zalicza AD będąca tematem rozprawy doktorskiej Kandydata. Odpowiedź trzewnego układu immunologicznego i jak również przepuszczalność jelitowa w kontekście modyfikacji składu i liczebności mikrobioty jelitowej w AD również pozostaje nieznana. Pragnę wskazać na oryginalność i sam zamysł badania oraz starania Doktoranta w kierunku podjęcia się tego tematu rozprawy, który wymaga doskonałej znajomości neurologii w powiązaniu z gastroenterologią zarówno doświadczalną jak przede wszystkim kliniczną, co niewątpliwie jest w opinii Recenzenta warte docenienia.

Wychodząc z tych założeń przedstawionych szczegółowo we Wstępie, Doktorant wykorzystał wiedzę na temat powyższych aspektów, już po części umocowaną w literaturze medycznej m.in. przez Opiekuna i zarazem Promotora tego przewodu doktorskiego Panią Doc. Agatę Mulak wraz z Doktorantem, co potwierdzam z wielką przyjemnością. Dr Kowalski zaplanował kilka celów badawczych z których najważniejszym była ocena częstości występowania zaburzeń ilościowych mikrobioty jelitowej w postaci tzw. zespołu przerostu bakteryjnego (SIBO) u pacjentów z AD w porównaniu do kontroli, przy użyciu wodorowego testu oddechowego z laktulozą. Ponadto w badanej grupie chorych z AD badano stężenie kalprotektyny i zonuliny w kale, które to biomarkery (zwłaszcza kalprotektyną) są uznanymi wyznacznikami m. in. ciężkości - odpowiednio stanu zapalnego jelit i przepuszczalności bariery jelitowej. Autor zaplanował korelację stopnia otępienia pacjentów z AD z dodatnim lub z ujemnym wynikiem testu oddechowego, aby zbadać potencjalny związek pomiędzy statusem ilościowymi mikrobioty jelitowej a badanymi stężeniami wspomnianych markerów w stolcu u tych chorych. W tym celu Doktorant przebadał 45 chorych ze zdiagnozowanym otępieniem łagodnego lub umiarkowanego stopnia w przebiegu AD, którzy co ważne, rekrutowali się z jednej jednostki, jaką był Ośrodek Badawczo-Naukowo-Dydaktyczny Chorób Otępiennych w Ścinawie. Ta możliwość sprawiła, że Autor pozyskał w miarę „homogenną” grupę pacjentów przebywających w tym samym miejscu i w czasie,

prorowadzonych w warunkach jednolitej diety i zalecanych restrykcji, dogodnych do np. testowania laktulozą. W opinii Recenzenta, Doktorant dobrze dobrał porównawczo grupę kontrolną w tych badaniach, gdyż stanowiło ją 16 osób dobranych pod względem wieku, płci i BMI, u których wykluczono otępienie i inne zaburzenia psychiczne oraz choroby OUN. W tym też celu Autor stworzył kwestionariusz który pozwolił na wspomniane wykluczenia w obu badanych grupach, m.in. na podstawie wywiadu lekarskiego, przyjmowanych leków, schorzeń współistniejących, aktualnych dolegliwości, itp. Diagnostykę prowadzono w oparciu o wodorowy test oddechowy w kierunku SIBO, testem ELISA mierzono stężenie kalprotektyny i zonuliny w próbkach stolca pobranych od tych chorych. Wyniki przedstawiono w większości w postaci median podając wyniki w górnych i dolnych kwartalach, oraz w procentach stosując do pomiarów jakościowych test ch-kwadrat. Niestandardowy rozkład analizowano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya i współczynnikiem R Spearmana dla cech ilościowych. Autor wykazał, że większość badanych (~80%) stanowiły kobiety a mediana wieku wynosiła 74 lata przy BMI ~27 kg/m². Ciekawe, że wśród pacjentów grupy kontrolnej częściej występowało migotanie przedsionków, chociaż można to tłumaczyć tym, że wspomniane objawy zaburzenia rytmu serca mogły być maskowane w grupie badanej z AD przez farmakoterapię, która stosowano u tych chorych z AD, a których to leków grupa kontrolna była pozbawiona. Doktorant potwierdził, że w grupie badanej, chorzy z AD przyjmowali w znacznie większym odsetku m. in. inhibitory AchE, memantynę, selektywne inhibitory wychwyty serotoniny (SSRI), kwetiapinę i inne neuroleptyki oraz NLPZ, w tym ASA. W grupie kontrolnej też częściej występowała zgaga oraz zaburzenia związane z oddawaniem moczu. Przerost bakteryjny (SIBO) zanotowano u prawie 1/2 badanych w stosunku do 25% w grupie kontrolnej. Mediana stężenia kalprotektyny w stolcu była podwyższona w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast stężenie zonuliny było znamienne niższe u chorych z AD w stosunku do grupy kontrolnej i podobne różnice w tych markerach zanotowano porównując pacjentów z AD z dodatnim z ujemnym wynikiem testu oddechowego.

Podsumowując własne wyniki Kandydat skonkludował, nie ma związku pomiędzy występowaniem SIBO a stężeniem kalprotektyny i zonuliny w stolcu u chorych z AD. Podobnie nie znaleziono istotnie statystycznych korelacji pomiędzy dodatnim i ujemnym wynikiem SIBO, a wiekiem, płcią, BMI i stopnia otępienia w skali MMSE oraz stosowanych leków. Zgaga występowała częściej w grupie pacjentów, u których wynik wodorowego testu oddechowego był ujemny. Nie stwierdzono zależności pomiędzy wynikiem w skali objawów

neurologicznych MMSE, a stężeniem kalprotektyny i stężeniem zonuliny. Ponadto nie wykazano związku pomiędzy stężeniem kalprotektyny i zonuliny a wiekiem, BMI, płcią, przyjmowanymi lekami czy zgłaszanymi objawami. U pacjentów z chorobą niedokrwienną serca mediana stężenia kalprotektyny była istotnie wyższa niż u pacjentów, u których schorzenie to nie występowało. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wprowadził stwierdzenie, że zespół SIBO występował częściej u pacjentów z AD, niż u osób w grupie kontrolnej bez demencji, niemniej różnica ta była nieznamienna statystycznie. Podobnie nie wykazano związku między występowaniem SIBO u pacjentów z AD a stopniem otępienia ocenianym według skali MMSE oraz pomiędzy stężeniem kalprotektyny i zonuliny w kale u pacjentów z AD a grupą kontrolną. Autor tłumaczy ten efekt farmakoterapią lekami cholinergicznymi stosowanymi w AD na wartości markerów stanu zapalnego jelit i przepuszczalności bariery jelitowej, z czym należy się zgodzić. Nie wykluczonym też jest fakt, że te negatywne wyniki mogą wynikać z stosunkowo niewielkiej liczebności grupy badanej lub też z faktu, że większość pacjentów z AD stanowiły kobiety o różnej aktywności endokrynnej hormonalnej w związku z wiekiem. Dlatego istnieje potrzeba dalszych badań, aby odpowiedzieć na pytanie czy na ustalenie tych zależności wpływa istotnie płeć, czy liczebność grupy badanej, czego w tym badaniu nie można było wykazać. Nie wykazano związku między występowaniem SIBO u pacjentów z AD a stężeniem kalprotektyny i zonuliny w kale oraz tych ostatnich, a więc kalprotektyny i zonuliny, a stopniem otępienia ocenianym według skali MMSE.

Wśród drobnych uwag krytycznych z racji Recenzenta tego przewodu, pragnę raczej pozostawić moje uwagi w kategorii dyskusji z Kandydatem, rozszerzając wątek zaprezentowany w pracy, a szczególnie w Dyskusji, gdzie Doktorant zwrócił uwagę na fakt, że skład mikrobioty jelitowej może wpływać na przepuszczalność błony śluzowej jelita, ale również bezpośrednio lub pośrednio na przepuszczalność bariery krew-mózg. Wiadomo, że skład mikrobioty i zmiany zasiedlania jelita przez florę czy to patogenną, czy probiotyczną, stanowi w istotnej mierze o przepuszczalności jelitowej, co zapewne skutkuje w warunkach patologicznych, w tym również w chorobie AD wpływem na różnice stężeń różnych bakteryjnych metabolitów w kale i w krwi. Aby to potwierdzić lub temu zaprzeczyć, należałoby wykonać badanie mikrobiomu bakterii u tych pacjentów, co jednak jest kosztowne i trudno wykonalne zwłaszcza w tej grupie chorych, dlatego Recenzent ma pełną świadomość tych ograniczeń. Jeśli jednak np. zabezpieczono krew lub osocze od tych pacjentów z AD, to pomiar np. krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) byłby wskazany aby

przynajmniej pośrednio, określić mikrobiologię bakterii u chorych z AD w tym zakresie i spodziewam się, że ta zdolność do produkcji SCFA byłaby u tych chorych z AD zahamowana. Można by rozszerzyć to badanie o efekt podawania tym chorym z AD probiotyków, co nie podniosłoby zapewne zbytnio kosztów badania, a dostarczyłoby dalszych ważnych informacji, w tej jak wspominałem wcześniej niemal „homogennej” grupie chorych z AD. Co do strony edytorskiej pracy, to nie stwierdziłem większych błędów w edycji tej pracy - może część opisów na temat podłoża amyloidowego AD powtarza się zbyt często w treści pracy, chociaż Wstęp daje już wystarczająco obszerny wgląd w ten aspekt schorzenia. Szerszego wyjaśnienia wymagałoby efekt zgagi, i zapewne odbijania, wzdęć, gazów czy mdłości, które mogą być wynikiem jak by można przypuszczać, zbyt małej ilości kwasu solnego u tych chorych z AD. Autor podaje na str. 67, że po blokowaniu AchE należałoby się spodziewać wzrostu wydzielania żołądkowego – niemniej u chorych z podeszłym wiekiem i z zdiagnozowanym SIBO, trudno oczekiwać takiego wzrostu wydzielania żołądkowego, a jednocześnie rozrostu SIBO, gdyż z wiekiem dochodzi z reguły do zmian atroficznych błony śluzowej kojarzonych z niedokwasotą, którą z wiekiem można dość powszechnie zaobserwować u osób starszych. Chorzy ci skarżą się na różne dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, dodatkowo powiązane z zwiększonym ryzykiem zakażenia *Helicobacter pylori* i nierzadko przyjmują inhibitory pompy protonowej (IPP), o czym Doktorant wspomina w tekście pracy.

Moje uwagi, a właściwie sugestie nie stanowią krytyki, a raczej skierowane są do Autora w celu zachęty do dalszych badań z tego zakresu i raczej pozostawiam je w kategorii dyskusji w Doktorantem. Te sugestie zaadresowane do Autora być może będą przyczynkiem do zainicjowania dalszych badań w tym zakresie, a żadna z moich uwag krytycznych absolutnie nie obniża wartości i mojej wysokiej oceny tej rozprawy. **W mojej opinii badania Lek med. Karola Kowalskiego przedstawione w postaci oryginalnej monografii, stanowi logiczny ciąg badań poczynany od najbardziej aktualnych zagadnień z zakresu patogenetyki choroby Alzheimera do pracy metodycznej zmierzającej do określenia zaburzeń gastroenterologicznych i mikrobiologicznych u chorych z tym schorzeniem, poddanych farmakoterapii i ocenianych nowoczesnymi testami bezinwazyjnymi na obecność SIBO i markerów zapalenia. Badania te wnoszą istotny wkład w poznanie i szerokie rozumienie dwukierunkowej osi mózgowo-trzewnej i trzewno-mózgowej i wielu innych aspektów nie tylko z zakresu neurologii i psychiatrii, ale również klinicznej gastroenterologii, mikrobiologii i farmakoterapii. Praca ta stanowi doskonale studium do otwarcia i**

poszerzenia nowych możliwości i perspektyw poznawczych, stymulując do dalszych badań multidyscyplinarnych. Dlatego pozwalam sobie zaproponować Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Doskonałości Naukowej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Przeto w konkluzji stwierdzam, że praca Pana lekarza medycyny Karola Kowalskiego spełnia wszystkie kryteria określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 65, poz. 595, z późn. zm.) stawiane kandydatom na stopień doktora nauk medycznych i zwracam się do Pana Dziekana Wydziału Lekarskiego i Szanownych Członków Rady Doskonałości Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie lekarza medycyny Karola Kowalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, dn. 1 marca 2021 r.

KIEROWNIK
Katedry Fizjologii UJ CM
Tomasz Brzozowski
Prof. zw. dr hab. n. med. Tomasz Brzozowski