



Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.

Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

Oponentský posudek

na dizertační práci Mgr. Dagmar Šrůtkové na téma: "Characterization and utilization of faecal microflora components in experimental models of human civilization diseases".

Předložená dizertační práce je souborem výsledků prací v oblasti lidského mikrobiomu. Spolu s pracovníky Gnotobiologické laboratoře Mikrobiologického ústavu, České akademie věd v Novém Hrádku řešila převážně v *in vitro* a *in vivo* myších modelech otázku vztahu střevní mikroflóry a slizničního imunitního systému hostitele při udržování slizniční homeostázy a význam imunomodulačního potenciálu probiotických kmenů v profylaxi nebo léčbě nespecifických střevních zánětů a alergie. Vlastní podíl na zásadních vědeckých otázkách ve vazbě na špičková pracoviště mikrobiologie, molekulární imunologie a gnotobiologie přinesl původní výsledky základního vědeckého a pro praxi aplikovaného výzkumu. Dosáhnout poznatků plně respektovaných v mezinárodním vědeckém světě ji umožnily nesmírně hluboké znalosti, píle a mimořádné invenční schopnosti při řešení dosud otevřených vědeckých problémů. Sem patří zejména izolace a bližší identifikace probiotického kmene *Bifidobacterium longum ssp. longum* CCM 7952 se schopností zabránit rozvoji závažné formy střevního zánětu zachováním exprese proteinů těsných spojů a tudíž úpravou funkce epitelové bariéry.

Autorka vysvětluje jasným a výstižným způsobem, proč právě profylaktické podávání kmene *Bifidobacterium longum ssp. longum* CCM 7952 na rozdíl od *B. longum* CCDM 372 (izolované ze vzorků stolice kojeného dítěte), zabránilo na *in vivo* myším modelu rozvoj těžkého střevního zánětu (indukovaného orálním podáváním roztoku dextran sulfátu sodného-DSS). Profylaktický efekt byl imunohistochemicky potvrzen zvýšenou expresí proteinů těsných spojů (zonulinu-1 a okludinu) a rovněž zachováním funkce epiteliální bariéry. Svými nálezy pomohla doložit na daném myším modelu možnost profylaktického použití v managementu nespecifických střevních zánětů.

Do oblasti nových poznatků nesporně patří i popis významného průkazu profylaktického účinku bakterie *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637 produkující butyrát na kolitidu indukovanou podáváním roztoku DSS u imunokompetentních BALB/c myši a imunodeficitních SCID myši. Zde byl profylaktický efekt prokázán chyběním



typických střevních příznaků kolitidy, které byly potlačeny zachováním proteinů těsných spojů, ale i obnovením normální produkce MUC-2 a snížením hladiny prozánětlivých cytokinů střevní sliznice TNF- α a IL-18.

Vedle těchto původních poznatků v oblasti profylaxe těžkého nespecifického střevního zánětu izolovanými kmeny s probiotickým účinkem je rovněž nesmírně důležitá a záslužná práce v oblasti prevence alergické reaktivity pomocí probiotických bakterií. Autorka se svými spolupracovníky prokázala na myším modelu alergie k březovému pylu, že neonatální monokolonizace bezmikrobních (GF) myší bakterií *B. longum ssp. longum* CCM 7952 dovede zabránit rozvoji alergické senzibilizace, pravděpodobně aktivací T regulační odpovědi. V těchto souvislostech docílila autorka v další části své práce velmi cenných poznatků, že kolonizace GF myší pomocí směsi bakterií *L. rhamnosus* LOCK0900, LOCK0908 a *L. casei* LOCK0919 vede rovněž ke zlepšení integrity střevní sliznice a ke zmírnění alergické senzibilizace k březovému pylu. Z toho vychází úvaha, že myší model časného profylaktického ovlivnění alergické senzibilizace pomocí bakterií mléčného kvašení by mohla být v poměrně krátkém časovém intervalu přenesena do klinické praxe.

Souborně lze shrnout: v dizertační práci obsažené výsledky studií autorky přinesly zásadní nové poznatky v oblasti lidského mikrobiomu, který byl analyzován na myším modelu. Nové poznatky se týkají nové taxonomické klasifikaci kmenů *Bifidobacterium longum* lidského původu metodami založenými na PCR, *in vitro* charakterizaci imunomodulačních vlastností vybraných bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a stanovení příznivého účinku vybraných bakterií v experimentálních myších modelech nespecifického střevního zánětu a pylové alergie. Autorka využila nejnovější metody molekulárně genetických studií. Mohla přesně definovat příčinné mechanismy profylaktického účinku vybraných probiotických bakterií z rodu *Bifidobacterium* (protektce proteinů těsných spojů a úprava funkce epitelové bariery).

Lze očekávat, že další systematické studie autorky budou přinášet nové prioritní poznatky, které vhodně doplní dnes již poznané mechanismy probiotického účinku v profylaxi nespecifických střevních zánětů a alergických onemocnění. Konečným cílem autorčiny vědecké skupiny by mohla být probiogenomická analýza popsaných bakterií a srovnání případných odlišností s doposud analyzovanými kmeny *B. longum*. Klinický význam lze očekávat i od přenosu (transplantace) fekální mikrobioty, který je na základě posledních, mnohdy rozporuplných léčebných přístupů, považována dnes za největší důkaz významu mikrobioty pro lidské zdraví.

Práce má příkladné strukturální členění, obsahově bohaté a doložené vyjádření ke zjištěným poznatkům ve vědním oboru lékařské mikrobiologie v těsné návaznosti na praktické medicínské obory. Obsahuje 289 citací prací ve světovém a vlastním písemnictví. Jsou přiloženy *in extenso* vlastní práce/11 zahraničních-dvkrát prvoautorství/. Dokládají mimořádný vědecký přínos autorky k aktuálnímu řešení základních biologických problémů v přesně



definované problematice těsně vázané na klinickou praxi. Práce splňuje všechna vysoce kladena kritéria pro dizertační práci.

K práci nemám připomínky, jen tři dotazy ve směru k profylaktickému nebo léčebnému použití probiotik.

1. U dětí s Crohnovou chorobou je u lehkých a středně těžkých forem doporučována iniciální léčba pomocí tzv. exkluzivní enterální výživy (EEV). Mechanismus účinku není dodnes zcela objasněn. Při studiu práce o vlivu *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637 produkující butyrát na kolitidu indukovanou podáváním roztoku DSS se nabízí otázka, zda některé produkty bakterií přítomné ve stolici pacientů s IBD nemohou být příčinou přechodné restaurace střevní sliznice v průběhu léčby pomocí EEV?
2. Jak si vysvětlujete značnou heterogenitu vlastností jednotlivých izolátů stejného kmene bakterií mléčného kvašení, např. *B. longum* CCM 7952 versus CCDM 372 (produkce cytokinů, vliv na integritu střevní sliznice, exprese proteinů těsných spojů apod.)?
3. V posledních dvou letech bylo publikováno několik prací zabývajících se roli mikrobioty v některých případech idiosynkrazie (odlišná farmakokinetika léku). Antibiotiky léčená myš, nebo myš bez bakteriální mikroflóry neodpovídá na léčbu cytostatiky tzv. platinium-based drugs: cisplatina nebo oxaliplatina na rozdíl od myši s adekvátní střevní mikrobiotou. Nevíte zda se někdo cíleně věnuje studiu těchto možných interakcí u bakterií mléčného kvašení?

V Olomouci, dne 25. listopadu 2015