

Zakład Alergologii i Immunologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa magister Arkadiusza Hoffmanna pt.
„Znaczenie wybranych rodzajów i gatunków mikrobioty jelitowej w rozwoju astmy
oskrzelowej”.**

Prof. dr hab. med. Krzysztof Kowal

Przedstawiona do recenzji praca doktorska „Znaczenie wybranych rodzajów i gatunków mikrobioty jelitowej w rozwoju astmy oskrzelowej” autorstwa magistra Arkadiusza Hoffmanna jest próbą wykazania różnic jakościowych i ilościowych mikrobioty jelitowej chorych na astmę oraz ich potencjalnych powiązań z patogenezą tego schorzenia i poszukiwaniem ewentualnych ścieżek terapeutycznych zależnych od mikro-środowiska jelit.

Badania flory bakteryjnej szczególnie w aspekcie jej patogenego oddziaływania na organizm ludzki trwają od wielu lat. Również w ocenie potencjalnego wpływu na funkcjonowanie dróg oddechowych od lat wykonuje się ocenę obecności bakterii oraz ich rodzaju stosując jako materiał płwocinę czy płyn płukania pęcherzykowo-oskrzelowego. Badania ostatnich lat pokazują, iż zaburzenia mikrobioty w odległych narządach mogą wpływać na funkcjonowanie układu oddechowego. Takie powiązania pomiędzy zaburzeniami mikrobioty jelitowej a przewlekłymi chorobami układu oddechowego, w tym astmy zostały wykazane w badaniach kohortowych z zastosowaniem różnych metod oceny składu flory jelitowej. Badania eksperymentalne przeprowadzone na zwierzętach w warunkach laboratoryjnych jednoznacznie wskazują na protekcyjny efekt obecności flory jelitowej na rozwój zapalenia alergicznego dróg oddechowych i pokazały możliwość modyfikowania tego zapalenia poprzez wpływ na skład mikrobioty jelitowej. Szereg badań u ludzi nie pokazały jednoznacznego efektu interwencji mających na celu modyfikowanie składu flory bakteryjnej

jelit na przebieg astmy. Warto jednak zwrócić uwagę, że jednym z ograniczeń tego rodzaju postępowania jest brak jednoznacznych, precyzyjnych danych dotyczących mikrobioty jelitowej chorych na astmę, która może różnić się nie tylko ze względu na obecność schorzenia, ale także w zależności od populacji, miejsca zamieszkania, stosowanych leków etc.. Astma jest jednym z najczęściej występujących przewlekłych schorzeń w całej populacji, a zdecydowanie najczęstszym w okresie dziecięcym. Ponieważ większość chorych zapada na astmę przed osiągnięciem dojrzałości, wpływ jej na rozwój młodej osoby jak również przyszłą produktywność w pracy jest ogromny. Wszelkie badania zmierzające do zrozumienia patogenezы astmy, jak również stworzenia nowych metod terapeutycznych czy profilaktycznych ma jak największe uzasadnienie zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i potencjalnych aplikacji w praktyce medycznej.

Podjęcie przez Doktoranta próby oceny rodzajów i gatunków mikrobioty jelitowej u chorych na astmę jest uzasadnione i stanowi kolejny krok naprzód w kierunku poznania patogenezы astmy i szukania potencjalnych opcji terapeutycznych mogących mieć znaczenie praktyczne w leczeniu tego schorzenia.

Badania zostały przeprowadzone w renomowanym Ośrodku posiadającym wieloletnie doświadczenie w badaniach molekularnych i genetycznych u chorych na astmę. Chorzy wyselekcjonowani zostali w Centrum Alergologii pod nadzorem bardzo doświadczonego alergologa.

Rozprawa przedstawiona jest na 116 stronach maszynopisu i ma typowy układ. Można w niej wyróżnić następujące części: Spis Treści, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Cel badania, Materiał i metody, Wyniki,

Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo, Spis tabel i rysunków oraz dwie Tabele uzupełniające, Kwestionariusz kwalifikacji pacjenta i Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej.

We Wstępie Doktorant przedstawił bardzo szeroko zagadnienie mikrobioty jako współegzystującego w organizmie człowieka olbrzymiego zbioru mikroorganizmów, które nieustannie oddziałują na funkcję narządów i tkanek gospodarza. Ponadto, Autor pracy przedstawił najnowsze, opublikowane fakty wskazujące na szczególnie duże znaczenie mikrobioty jelitowej, ze względu na olbrzymią ilość i różnorodność znajdujących się tam mikroorganizmów oraz ich niewątpliwy efekt na funkcję pozostałych narządów organizmu człowieka. Szczególną uwagę zwrócono na pokazanie dowodów na oddziaływanie mikrobioty jelitowej na funkcję układu oddechowego, w tym na patologiczne procesy zapalne dróg oddechowych, takie, z jakimi mamy do czynienia w astmie. Z przedstawionych we Wstępie danych jasno wynika, iż badania dotyczące mikrobiomu jelitowego u chorych na astmę mogą odegrać bardzo istotne znaczenie w zdefiniowaniu i stworzeniu nowych metod profilaktycznych i/lub terapeutycznych w astmie.

Cel badania jest jasno sformułowany i stanowi kontynuację rozważań przedstawionych we Wstępie.

Chorzy i osoby z grupy kontrolnej zostali wyselekcjonowani w Ośrodku posiadającym wieloletnie doświadczenie w diagnostyce i leczeniu chorych na astmę i inne choroby alergiczne, który kierowany jest przez bardzo doświadczonego alergologa. Część eksperymentalna została przeprowadzona w renomowanym Ośrodku posiadającym olbrzymie doświadczenie w badaniach molekularnych i genetycznych w astmie. Wybrane metody są jak najbardziej adekwatne do realizacji postawionych zadań. Doktorant bardzo słusznie założył, iż analiza mikrobiomu przy pomocy nowoczesnych, jednakże dobrze sprawdzonych i wystandaryzowanych metod sekwencjonowania nowej generacji pozwoli na najbardziej precyzyjne określenie różnorodności mikrobioty jelitowej u chorych na astmę.

Wygenerowanie przy pomocy takich metod olbrzymiej liczby danych wymaga bardzo dokładnego i właściwego ich przygotowania i odpowiedniego opracowania statystycznego. Doktorant bardzo rozsądnie podszedł do tego zagadnienia wykonując wstępne opracowanie danych przy użyciu oprogramowania Kraken w oparciu o platformę Galaxy pozwalających na wiarygodną ocenę różnorodności sekwencji bakteryjnych. Dobre przygotowanie danych umożliwiło zastosowanie standardowych testów nieparametrycznych w celu wykazania różnic mikrobiomu. Do dalszego, lepszego zrozumienia różnorodności mikrobioty jelitowej posłużyły analizy różnorodności alfa i beta oraz klastrowanie hierarchiczne.

Właściwie dobrane metody analizy danych pozwoliły na przedstawienie ogromnej liczby wyników w sposób jasny. Szczególnie zastosowanie dobrze zaprojektowanych rycin pozwala na perspektywiczny obraz różnorodności mikrobioty u poszczególnych chorych oraz osób z grupy kontrolnej, co oczywiście bardzo ułatwia wykonanie porównania tych wyników u poszczególnych osób i w poszczególnych grupach.

W Dyskusji Doktorant porównuje własne wyniki z wynikami ostatnio opublikowanych badań. Zwraca uwagę na płynące z analizy danych wskazówki, co do potencjalnego zastosowania uzyskanych danych w praktyce klinicznej. Autor pracy zwraca również uwagę na ograniczenia swoich badań wskazując przede wszystkim małą liczbę chorych i osób z grupy kontrolnej.

Wyciągnięte przez Doktoranta wnioski w pełni odpowiadają na postawione we wstępnym etapie pracy cele badawcze i jasno wynikają z uzyskanych danych.

Praca doktorska zawiera 202 pozycje piśmiennictwa, z czego znaczna większość została opublikowana w ciągu ostatnich 10 lat.

Dołączając się do dyskusji bardzo proszę o odniesienie się w trakcie obrony pracy doktorskiej do przedstawionych poniżej pytań/uwag.

Czy kwalifikując chorych do badań wzięto pod uwagę miejsce urodzenia i zamieszkania (w aspekcie miasto/wieś)? Jeżeli tak to dobrze byłoby przedstawić te dane w trakcie obrony pracy doktorskiej.

W tekście pracy doktorskiej odniesienie dotyczące badanych osób jest bardzo lakoniczne tj. nie stwierdzono różnic. Jednak w „Kwestionariuszu kwalifikacji pacjenta” widnieje szereg pytań, które mogą dodać nieco informacji do interpretacji danych. W trakcie obrony pracy doktorskiej dobrze byłoby przedstawić co najmniej stopień ciężkości astmy, stosowane leki oraz skrótowo wynik testów w kierunku alergii wziewnej.

Czy znane są Doktorantowi jakieś unikalne cechy metabolizmu bakterii klas *Cytophagia*, *Ignavibacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Metanomikrobia*, *Opitutae* lub *Nitrospira*, które mogłyby odgrywać rolę w patogenezie astmy lub alergicznego zapalenia?

Czy Doktorant posiada dane na temat potencjalnej wrażliwości/oporności na antybiotyki bakterii z ww. klas, co mogłyby odgrywać rolę w ich rozwoju w jelitach u osób stosujących popularne antybiotyki?

Na stronie 7 Doktorant użył wyrażenia „alergenami aeroalergicznymi”. Myślę, że lepiej brzmiałoby „alergenami wziewnymi”.

Na stronie 14 zdanie „Natomiast kwas indolepropionowy jest silnie skorelowany ze spożyciem błonnika pokarmowego i ma silne działanie wymiatające wolne rodniki *in vitro* w celu zmniejszenia ryzyka zachorowania na cukrzycę typu 2.” nie jest jasne.

Na stronie 20 stwierdzenie „Suplementacja myszy bakteriami..” Chyba poprawniej brzmiałoby „Suplementacja pokarmu....”.

Co Doktorant miał na myśli pisząc na stronie 84 następujące zdanie: „Naukowcy podejrzewają, że histamina indukuje odpowiedzi przeciwko receptorowi histaminowemu H2 w płucach”?

Na stronie 85 Doktorant stwierdza: „Innym ważnym metabolitem zależnym od mikrobioty jest tryptofan, który może regulować produkcję serotoniny i wpływać tym samym na funkcjonowanie mózgu, przyczyniając się nawet do chorób psychicznych”. Czy tryptofan może być również w jakiś sposób zaangażowany w regulację odpowiedzi zapalnej?

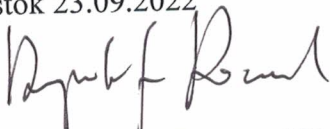
Przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy, a stanowią jedynie chęć recenzenta do włączenia się do debaty nad tak ciekawym i nowatorskim podejściem do badań nad patogenezą astmy. Powyższa praca jest kolejnym krokiem do zrozumienia wielowątkowego zagadnienia patogenezы astmy jak również innych chorób alergicznych. Może ona zaowocować w przyszłości opracowaniem nowatorskiego podejścia do leczenia lub prewencji chorób alergicznych.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz w oparciu o art.179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. – przepisy wprowadzające Ustawę Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 r poz.1669). Magister Arkadiusz Hoffmann podjął bardzo ciekawą tematykę dotyczącą patogenezы astmy. Postawił sobie jasne zadanie badawcze, które realizował w oryginalny sposób stosując nowoczesne metody biologii molekularnej oraz złożoną analizę danych. Dobrze zaplanowane badania, w połączeniu z odpowiednim doborem chorych wykonanym w znanym centrum leczenia chorób alergicznych oraz nowoczesne badania przeprowadzone w renomowanym ośrodku badawczym, pod kierunkiem eksperta w tej dziedzinie doprowadziło do zrealizowania zaplanowanych

założeń. Doktorant wykazał się dużą wiedzą w dziedzinie immunologii i biologii molekularnej oraz umiejętnością powiązania jej do prowadzenia pracy naukowej, postawienia hipotez naukowych i rozstrzygnięcia ich w oparciu o dobrze wykonane badania i przeprowadzone analizy. Niniejszym wnioskuję o dopuszczenie powyższej pracy do publicznej obrony i uznanie powyższej pracy za wyróżniającą się.

Białystok 23.09.2022



Prof. dr hab. med. Krzysztof Kowal