WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej
Wydział Lekarsko-Dentystyczny

Warszawa, 24.06.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Agnieszki Sroki-Oleksiak
pt. „Badanie flory bakteryjnej odcinka dwunastniczego u pacjentów z otyłością oraz cukrzycą typu 2 i otyłością z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Sroki-Oleksiak dotyczy niezmiernie ważnego i aktualnego zagadnienia, jakim jest potencjalna rola mikroflory przewodu pokarmowego w etiopatogenezie niektórych chorób u ludzi. Od dawna znane są liczne funkcje, jakie pełni mikrobiota fizjologiczna w utrzymaniu stanu zdrowia człowieka, obecnie jednak coraz więcej danych w literaturze naukowej wskazuje na rolę jakościowych i ilościowych zmian w składzie mikrobioty w wywoływaniu wielu chorób. Większość publikacji dotyczy mikroflory jelita grubego, natomiast doniesienia naukowe odnoszące się do proksymalnego odcinka przewodu pokarmowego są na świecie stosunkowo nieliczne, a w Polsce brak jest dotąd publikacji na temat tego typu badań. W recenzowanej rozprawie Doktorantka poddała badaniom metagenomicznym mikroflorę obecną w próbkach biopsyjnych dwunastnicy, pobranych od pacjentów z otyłością, z cukrzycą typu 2 i otyłością oraz od osób zdrowych.

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska ma układ typowy dla tego typu opracowań naukowych i zawiera 136 stron, w tym 13 tabel, 39 rycin oraz 3 załączniki. Pracę cechuje bardzo bogata szata graficzna w postaci licznych kolorowych rycin autorstwa Doktorantki, które w sposób wyjątkowo przejrzysty ilustrują tematykę będącą przedmiotem rozprawy oraz zasadę eksperymentów przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Umieszczenie na każdej stronie dysertacji tytułu danego rozdziału ułatwia lekturę rozprawy.

W rozdziale „Wstęp" Doktorantka zawarła obszerny rys historyczny oraz opis aktualnego stanu wiedzy w zakresie identyfikacji drobnoustrojów metodami molekularnymi, w tym technikami sekwencjonowania drugiej i trzeciej generacji. Dużą część wstępu stanowi charakterystyka mikrobioty jelitowej – jej skład gatunkowy w zależności od odcinka przewodu pokarmowego i dostępności tlenu oraz rola w organizmie gospodarza. Zgodnie z tematem rozprawy doktorskiej, Autorka szczegółowo opisała potencjalne mechanizmy udziału bakterii

w etiopatogenezie otyłości i cukrzycy typu 2, a także operacyjne metody leczenia tych schorzeń (tzw. chirurgia metaboliczna).

W rozdziale „Założenia i cele pracy" Doktorantka jako cel główny podjętych badań naukowych określiła dokonanie analizy składu mikroflory błony śluzowej dwunastnicy w trzech grupach – u pacjentów z otyłością, u osób z otyłością i cukrzycą typu 2 oraz w grupie osób zdrowych. Doktorantka sformułowała ponadto 4 szczegółowe cele badawcze: opracowanie i standaryzację metody amplifikacji, zwiększenie czułości i swoistości tej metody poprzez zaprojektowanie dodatkowej pary starterów, porównanie między w/w grupami danych jakościowych i ilościowych uzyskanych w trakcie sekwencjonowania, a także zestawienie tych danych z wybranymi parametrami metabolizmu glukozy i lipidów oraz z wiekiem pacjenta i wskaźnikiem masy ciała.

Rozdział „Materiał" zawiera kryteria włączenia pacjentów do w/w grup lub ich wykluczenia, rodzaj pobieranych próbek materiału biologicznego i sposób ich przechowywania do czasu wykonania badań molekularnych, a także zakres badań laboratoryjnych krwi pacjentów biorących udział w badaniu. Istnieje jednak niezgodność w zakresie górnej granicy wieku osób objętych badaniem – w tabeli 2 została ona określona jako 70 lat, natomiast wśród kryteriów wykluczenia podany jest wiek >75 roku życia. Konieczne jest też sprecyzowanie liczby pacjentów, którzy wzięli udział w badaniu – Doktorantka podała, że zakwalifikowano łącznie 86 pacjentów (str. 43), jednak liczba osób w poszczególnych grupach (17 pacjentów z otyłością, 22 osoby z otyłością i cukrzycą typu 2 oraz 27 zdrowych osób w grupie kontrolnej) wskazuje, że było ich w sumie 66 (także ryc. 34, str. 81). W dalszej części tego rozdziału Doktorantka zaznaczyła, że z przyczyn od Niej niezależnych nie było możliwe zbadanie mikrobioty w próbkach kału pacjentów przed zabiegiem bariatrycznym, jak również w bioptatach dwunastnicy i w próbkach kału pobranych 6 tygodni po operacji.

W rozdziale „Metody" Doktorantka podała szczegółowy opis zastosowanych technik badawczych, co świadczy o ich biegłej znajomości przez Autorkę rozprawy W formie tabeli podane są bufory i odczynniki zastosowane w trakcie badań. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka opisała zasady bioinformatycznej analizy danych uzyskanych w wyniku sekwencjonowania oraz zastosowane testy statystyczne. W tekście tego rozdziału są błędy wymagające korekty edytorskiej, np. „pomiaru stężenia badanych próbek" (str. 46), co należy rozumieć jako „pomiaru stężenia DNA w badanych próbkach" oraz używania terminu „ilości" zamiast „liczby", np. cykli. Wskazane byłoby ujednolicenie pisowni metody *nested-PCR* (także w innych rozdziałach rozprawy). Należy zmienić numerację rycin 14, 15 i 16, by odpowiadała kolejności, w jakiej są odnośniki do tych rycin w tekście (str. 55: kolejno 16, 14, a następnie 15).

Rozdział „Wyniki" został podzielony na 7 podrozdziałów, co ułatwia analizę danych uzyskanych w trakcie szerokiego zakresu badań wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Rozdział ten jest bardzo bogato zilustrowany przez Doktorantkę, co przyczynia się do przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników. Uważam jednak, że niewłaściwe jest używanie przez Autorkę w tekście rozprawy w języku polskim – słów w języku angielskim, bez ich wyróżnienia (w cudzysłowie lub kursywą); szczególnie często dotyczy to słów *control* oraz *obese* (np. tabela 6, rycina 25, str. 80-86 i wiele innych), a także słowa *index* (z odmianą przez przypadki – indexem, indexu) – zamiast słowa indeks lub wskaźnik. Należy też zaznaczyć, że zgodnie z obowiązującymi zasadami nazwy rodzin powinny być pisane kursywą (np. str. 83, 85 i inne).

W rozdziale „Dyskusja" Autorka rozprawy zawarła bardzo ciekawe zestawienie wyników badań własnych z doniesieniami w literaturze naukowej. Doktorantka zaznaczyła, że niniejsza rozprawa jest pierwszym w Polsce doniesieniem o składzie mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy u pacjentów z otyłością oraz z cukrzycą typu 2 i otyłością. Świadczy to o nowatorskim charakterze recenzowanej pracy. Jednocześnie Autorka rozprawy zwraca uwagę na trudności techniczne związane z wykonywaniem tych badań, co może wpłynąć na ich czułość i swoistość, a także na konieczność wyboru odpowiedniego oprogramowania do analizy bioinformatycznej uzyskanych danych. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka wskazuje na potencjalne możliwości modyfikacji mikrobioty człowieka (w tym mikroflory proksymalnego odcinka przewodu pokarmowego) w terapii i/lub profilaktyce otyłości oraz cukrzycy typu 2. Szczególnie interesujące są rozważania na temat potencjalnej patogennej roli gatunków uznawanych dotąd za środowiskowe oraz konieczności uwzględnienia w dalszych analizach frakcji bakterii aktywnych metabolicznie w stosunku do całkowitej liczby bakterii występujących w przewodzie pokarmowym. Doktorantka zwraca też uwagę na możliwość kontaminacji odczynników stosowanych w badaniach metagenomicznych, co może powodować brak spójności wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach oraz ryzyko sformułowania błędnych wniosków. Rozważania te świadczą o dojrzałości Doktorantki w zakresie planowania i prowadzenia prac naukowych oraz właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

Doktorantka sformułowała w rozprawie 7 wniosków, odpowiadających głównemu celowi i szczegółowym celom badawczym założonym w tej pracy. Szczególnie ciekawe jest wykazanie przez Autorkę rozprawy dodatniej korelacji między liczebnością bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* ze stężeniem HDL u pacjentów z otyłością i cukrzycą typu 2, co zdaniem Doktorantki może w przyszłości stanowić rodzaj biomarkera zaburzeń składu mikrobioty przewodu pokarmowego u tych chorych.

Rozdział „Literatura" zawiera spis piśmiennictwa obejmujący 164 pozycje według kolejności cytowania w tekście. Doktorantka odpowiednio dobrała literaturę dotyczącą niniejszej rozprawy i właściwie zacytowała poszczególne publikacje w rozdziałach „Wstęp" oraz „Dyskusja". Znaczną część piśmiennictwa stanowią publikacje z ostatnich 5 lat (2014 – 2018). Rozdział ten wymaga korekty edytorskiej zapisu niektórych pozycji literatury.

Wśród załączników umieszczonych na końcu rozprawy znajduje się pozytywna opinia Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań, Karta Pacjenta (opracowana na potrzeby niniejszych badań) oraz szczegółowy wykaz bakterii wykrytych w badanych próbkach.

Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem zaznaczyć, że lekturę rozprawy utrudnia niewłaściwe zastosowanie w tekście znaków interpunkcyjnych, jak również zauważyłam błędy literowe i stylistyczne. Oczywiście powyższe uwagi nie mają wpływu na wartość merytoryczną dysertacji, jednak podczas przygotowywania publikacji opartych na niniejszej rozprawie doktorskiej należy dokonać poprawek edytorskich.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Agnieszki Sroki-Oleksiak oceniam pod względem merytorycznym bardzo wysoko. Temat pracy doktorskiej został jasno określony i wnikliwie opracowany przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Uzyskane wyniki stanowią ważny wkład w zakresie poznania potencjalnej patogennej roli mikrobioty dwunastnicy.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Agnieszki Sroki-Oleksiak spełnia wszystkie kryteria i ustawowe wymogi, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk medycznych. Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Sroki-Oleksiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej ze względu na innowacyjność podjętego tematu i jego wnikliwe opracowanie przy użyciu nowoczesnych technik badawczych.

KIEROWNIK
Zakładu Mikrobiologii Stomatologicznej

prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska