



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Prof. dr hab. Barbara Dołęgowska
Katedra Mikrobiologii, Immunologii
i Medycyny Laboratoryjnej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin
Tel.: 697 909 238
E-mail: barbara.dolegowska@pum.edu.pl

Szczecin, 26.04.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Pauliny Pecyny pt.

„Charakterystyka i określenie roli elementu bakteryjnego mikrobiomu jelit w etiologii zespołu jelita drażliwego z zastosowaniem sekwencjonowania 16S rRNA”

Promotor: Prof. dr hab. Marzena Gajęcka

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Dorota Nowak-Malczewska

Praca została zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Zespół jelita drażliwego (IBS) jest jedną z najczęściej rozpoznawanych, przewlekłych chorób jelita cienkiego i grubego, objawiającą się bólem brzucha i zaburzeniami rytmu wypróżnień, które nie są uwarunkowane zmianami organicznymi, czy biochemicznymi. Przyczyna zespołu nie została dotychczas poznana. Wśród czynników patofizjologicznych za najważniejsze uważa się zaburzenia regulacji osi mózg–jelito, wzmożenie czucia trzewnego, zaburzenia czynności motorycznej i wydzielniczej jelit, przebyte biegunki infekcyjnej oraz zaburzenia składu mikrobioty jelitowej. Objawy zespołu jelita drażliwego są bardzo zmienne, z okresami poprawy i zaostrzeń. U większości chorych dolegliwości uporczywie nawracają, ale choroba ma raczej łagodny przebieg i nie prowadzi do wyniszczenia ani innych poważnych następstw. Kryteria Rzymskie IV z 2016 r. podają wytyczne pozwalające na rozpoznanie IBS, jednak w dalszym ciągu wiedza o przyczynach tej choroby jest niewystarczająca dla pełnego zrozumienia jej etiopatogenezy i opracowania leczenia celowanego oraz postępowania profilaktycznego. Problem podjęty przez Panią Mgr Paulinę

Pecynę jest zatem bardzo aktualny. Doktorantka podjęła się zadania określenia zmian ilościowych i jakościowych mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem jelita drażliwego.

Praca została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz skrótów i załączniki.

Rozprawa została przedstawiona na 201 stronach, zawiera 25 rycin, 34 tabele i 16 załączników. Pomędzy poszczególnymi częściami pracy zostały zachowane właściwe proporcje. Rozprawa jest napisana bardzo starannie. Spisy treści, tabel, rycin i załączników umożliwiają jej szybkie przeglądanie i powrót do najbardziej interesujących fragmentów.

Wstęp poświęcony został omówieniu zagadnień związanych z tematem pracy oraz uzasadnieniu celowości podjętych badań. Autorka przedstawiła w nim aktualną wiedzę na temat wpływu mikrobioty na organizm człowieka, wzajemnych oddziaływań i zależności pomiędzy człowiekiem i drobnoustrojami. Szczegółowo scharakteryzowała mikrobiotę przewodu pokarmowego, czynniki mające wpływ na jej zróżnicowanie, a także opisała rolę jaką mikrobiota pełni w metabolizmie oraz w czynności układu immunologicznego. Ważną częścią wstępu jest podrozdział poświęcony technikom sekwencjonowania 16S rRNA, wykorzystywanym w ocenie mikrobioty jelit. W ostatniej części rozdziału Doktorantka umieściła informacje dotyczące diagnostyki zespołu jelita drażliwego. Pierwszy rozdział rozprawy świadczy o bardzo gruntownym zapoznaniu się z problematyką dotyczącą podjętych badań.

Celem rozprawy była identyfikacja i charakterystyka elementu bakteryjnego mikrobiomu jelitowego pacjentów z zespołem jelita drażliwego poprzez porównanie jego składu z mikrobiomem jelit osób bez dolegliwości żołądkowo-jelitowych, z uwzględnieniem typów zespołu jelita drażliwego i płci uczestników badania. Analizie poddano również wpływ spożywanych produktów mlecznych na mikrobiom jelitowy oraz wiedzę uczestników badania o prebiotykach.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera opis kryteriów włączenia i wyłączenia pacjentów z grupy badanej oraz uczestników z grupy kontrolnej, a także opis wykorzystanych metod badawczych. Ich bardzo szczegółowy opis z pewnością będzie mógł posłużyć naukowcom chcącym w przyszłości powtórzyć i/lub kontynuować badania zrealizowane przez Doktorantkę. Rozdział ten świadczy o doskonałej biegłości w zakresie wykonywanych oznaczeń, a także przeprowadzanych analiz biostatycznych.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła wyniki swoich badań. Zostały one poprzedzone eksperymentem pozwalającym na wybór optymalnego zestawu do izolacji DNA

z prób kału. Każdy etap analityczny podlegał weryfikacji jakościowej i ilościowej. Ocena mikrobioty przeprowadzono na siedmiu poziomach taksonomicznych. Określono przynależność bakterii i archeonów do królestwa, typu, klasy, rzędu, rodziny, rodzaju i gatunku. Wyniki identyfikacji drobnoustrojów oraz częstości ich występowania na poszczególnych poziomach przynależności taksonomicznej, z podziałem na grupy pacjentów z zespołem jelita drażliwego i osób zdrowych oraz różnicowaniem na kobiety i mężczyzn, zostały przedstawione w tabelach i na rycinach. Doktorantka przeprowadziła analizę kluczowych elementów bakteryjnych mikrobiomów jelit dla każdej z badanych grup oraz ocenę ich bioróżnorodności wykorzystując adekwatne testy statystyczne. Rozdział kończy analiza statystyczna wpływu spożycia produktów mlecznych na mikrobiotę jelit i ocena wiedzy o prebiotykach pomiędzy pacjentami oraz osobami bez dolegliwości żołądkowo-jelitowych. Uzyskane wyniki badań i sposób ich przedstawienia świadczą o doskonałym warsztacie metodycznym, wiedzy teoretycznej i praktycznej oraz ogromnej pracowitości Doktorantki.

Kolejny rozdział – „Dyskusja” dowodzi bardzo dobrej znajomości tematu i znakomitej orientacji w aktualnym, bardzo obszernym piśmiennictwie, liczącym 283 pozycji, dotyczącym analizowanych tematów badawczych. Rozdział ten potwierdza bardzo duże zdolności analityczne i interpretacyjne Autorki. Podsumowując dyskusję Doktorantka wskazuje, że zespół jelita drażliwego może być powiązany z zaburzeniami składu mikrobioty jelitowej. Podkreśla jednak jak wiele czynników wpływa na mikrobiotę, co w połączeniu z pewnymi ograniczeniami stosowanych metod sekwencjonowania powoduje, że jest to obecnie wskazanie kierunku badań mikrobioty.

Przedstawione wnioski stanowią odpowiedź na założone cele. Doktorantka stwierdziła, że występują różnice w składzie elementu bakteryjnego mikrobiomów jelit pomiędzy pacjentami z zespołem jelita drażliwego, a osobami bez dolegliwości żołądkowo-jelitowych. Mikrobiota u pacjentów z IBS jest bardziej zróżnicowana, przy czym stopień zróżnicowania u kobiet jest większy. Wskazuje to na konieczność uwzględniania w kolejnych badaniach kryterium podziału na płeć. Autorka nie stwierdziła zależności pomiędzy składem mikrobioty i typem zespołu jelita drażliwego określonym na podstawie Kryteriów Rzymskich IV. Z kolei dieta bogata w produkty mleczne istotnie wpływa na skład mikrobioty jelitowej. Osoby objęte badaniami nie różniły się poziomem wiedzy na temat probiotyków – niezależnie od grupy badanej.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne nieścisłości, które pojawiły się w przedstawionej mi do oceny pracy. Strona 18, wiersz 10: „Niekorzystne dla

drobnoustrojów środowisko żołądka, wynikające z obecności kwasu żółciowego oraz soków trawiennych, powoduje zmiany jakościowe i ilościowe mikrobioty w dwunastnicy...”? wiersz 28: „Najczęściej występują bakterie bezwzględnie beztlenowe oraz względnie tlenowe”? Strona 28, wiersz 7: „Na odcinku przewodu pokarmowego żołądka oraz jelit...”? Strona 30, wiersz 22: „...dieta o niskiej zawartości błonnika znacznie przyczynia się do alergicznego zapalenia dróg oddechowych podczas aplikacji przeciwzapalnego propionianu, który redukuje wydzielanie szeregu interleukin w płucach”? Strona 154, wiersz 4: „Mikrobiota jelit pacjentów z IBS różni się pod względem składu w porównaniu do osób z grupy kontrolnej” (czy może: w porównaniu do mikrobioty osób z grupy kontrolnej?). Sugeruję, aby podczas pisania publikacji preredagować/poprawić powyższe zdania. W pracy jest także pewna liczba błędów literowych, których obecność ze względu na objętość rozprawy jest zrozumiała. Powyższe uwagi mają jedynie charakter redakcyjny i w żadnej mierze nie umniejszają ogromnej wartości pracy.

Praca doktorska Pani Mgr Pauliny Pecyny została zrealizowana w ramach projektu PRELUDIUM 11, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Stanowi samodzielny dorobek naukowy. Realizacja badań wymagała olbrzymiego nakładu pracy i wielu umiejętności. Praca wnosi nowe, ważne informacje do dotychczasowego stanu wiedzy, otwiera nowe możliwości postępowania badawczego w podjętym przez Doktorantkę temacie.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani Mgr Pauliny Pecyny do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy *summa cum laude*.

Z wyrazami szacunku,

Barbara Dotygowska