

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia1.1.-10.-2023...
L.dz.225.....

Łódź, dnia 05 października 2023 r.

Prof. dr hab. Joanna Saluk
Katedra Biochemii Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódźki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Pauliny Marii Żebrowskiej-Różańskiej

zatytułowanej:

„Analiza mikrobioty jelitowej dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu”

wykonanej w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki,
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

pod kierunkiem **dr hab. Łukasza Łaczmąńskiego, prof. IITD PAN**

promotor pomocniczy: **dr n. med. Paweł Karpiński**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac doktorskich. Wprowadzenie w tematykę badań niniejszej rozprawy stanowi Wstęp uzasadniający założenia pracy oraz celowość ich podjęcia, w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. W tej wprowadzającej części Doktorantka podjęła się zdefiniowania pojęcia zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD) poprzez szeroką klasyfikację deficytów, w tym relacyjnych (społeczno-emocjonalnych) oraz rozwojowych (obejmujących rozwój psychoruchowy). Podała krótką

charakterystykę epidemiologiczną obejmującą identyfikację przypadków spełniających kryteria diagnozy ASD. Jak również wskazała na wieloczynnikową etiologię tych zaburzeń, łączącą wzajemne oddziaływania czynników genetycznych, epigenetycznych oraz środowiskowych, co stanowi możliwą, lecz niejasną przyczynę tych złożonych zaburzeń określanymi wspólnym terminem jako zaburzenia ze spektrum autyzmu.

Tematyka, której podjęła się Doktorantka dotyczy analizy składu mikrobiomu jelitowego w kontekście różnic występujących u dzieci z orzeczonymi zaburzeniami ze spektrum autyzmu. We Wstępie pracy Autorska stara się zatem scharakteryzować czynniki stanowiące zmienne potencjalnie oddziałujące na różnorodność mikrobioty jelitowej, a także uzasadnia znaczenie tematyki podjętych przez Nią badań, podkreślając dane literaturowe świadczące o istnieniu zależności pomiędzy zaburzeniami w zakresie ASD a wzorcami kolonizacji mikrobioty. Zagadnienia stanowiące podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej wpisują się w nurt aktualnych badań prowadzonych na Świecie na przestrzeni ostatnich dekad, które dostarczają przełomowych obserwacji dowodząc immunologiczno-metaboliczno-endokrynnej funkcji regulacyjnej mikrobiomu jelitowego oraz jego znaczącej roli w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. W tym kontekście problematyka zmienności składu mikrobioty jelitowej i jego wpływu na homeostazę podkreśla zasadność prowadzenia badań w przypadku tak złożonych zaburzeń jak ASD. Co raz więcej badań genetycznych, fenotypowych i funkcjonalnych podkreśla udział mikrobioty i jej metabolitów w kształtowaniu objawów spektrum autyzmu, jednak pojawiają się również badania wskazujące odwrotny kierunek przyczynowo-skutkowy, gdzie zmienne wzorce żywieniowe w ASD uważa się za główny determinant składu mikrobioty w tym schorzeniu.

Analizując złożoną naturę przedstawionego problemu nie sposób przecenić badania podjęte przez Doktorantkę w celu pogłębienia aktualnego stanu wiedzy.

Celem szczegółowym recenzowanej rozprawy doktorskiej była analiza zmierzająca do wykazania różnic w składzie mikrobioty fekalnej w trzech grupach badanych, tj: u dzieci z ASD, ich neurotypowego rodzeństwa oraz w grupie neurotypowych dzieci niespokrewnionych.

Dobór uczestników badania, a także zaplanowane w pracy metody badawcze, w tym analizy genetyczne, wieloparametryczne analizy bioinformatyczne oraz badanie ankietowe wskazują, że koncepcja rozprawy doktorskiej jest bardzo dobrze przemyślana, szczegółowo zaplanowana i wielowątkowa. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w celu scharakteryzowania badanej mikrobioty Doktorantka wykonała nowoczesną metodę badawczą, jaką jest sekwencjonowanie NGS analizując zmienne regiony V3-V4 i V7-V9 genu markerowego 16S rRNA. Zasadę metody oraz przebieg wykonania analizy Doktorantka opisała szczegółowo w rozdziale Materiały i metody. Przeprowadzone przez Doktorantkę zaawansowane analizy bioinformatyczne, a także doskonale opracowane narzędzie badania

ankietowego świadczy o Jej ogromnym zaangażowaniu badawczym i o bardzo dużej dojrzałości naukowej. Podkreślić należy również obszerny opis wykorzystanych narzędzi bioinformatycznych, w tym precyzyjne uzasadnienie merytoryczne zastosowania wieloparametrycznej analizy. W analizie mikroorganizmów Doktorantka oceniała zarówno różnorodność (w tym pokrewieństwo filogenetyczne) taksonów obecnych w danej próbce (czyli w danym mikrobiomie) jak i równomierność z jaką zidentyfikowane taksony są w tej próbce reprezentowane. Następnie parametry te zostały zanalizowane w kontekście różnic pomiędzy badanymi grupami. Ponadto, Doktorantka podjęła się analizy różnic obfitości danych taksonów, tj. ilościowego określenia całkowitego ładunku mikrobiologicznego, wykraczającego poza miarę względnej obfitości uwzględniającej jedynie proporcjonalny skład mikrobiomu. Doktorantka dokonała też szczegółowego przeglądu literatury w kontekście opisywanej metodyki, z dużą dojrzałością wskazując wiele ograniczeń tej analizy. Ostatnim etapem złożonej analizy bioinformatycznej było przewidywanie przybliżonego profilu funkcjonalnego mikrobiomów badanych grup, co jak podkreśliła Doktorantka, stanowiło dodatkową, bezkosztową w kontekście wykonanej metody NGS, analizę funkcjonalną. Aktywność metaboliczną badanego mikrobiomu oceniła również poprzez oznaczenie poziomu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych będących produktem metabolizmu mikroorganizmów jelitowych, które zostało wykonane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Pomimo zastosowania w pracy nowoczesnych metod laboratoryjnych oraz zaawansowanych analiz bioinformatycznych, moje największe uznanie wzbudziło niezwykle starannie zaplanowane, wieloaspektowe badanie ankietowe, którego celem było zebranie wywiadu perinatalnego i demograficznego oraz określenie nawyków żywieniowych i informacji o bieżącym stanie zdrowia, w oparciu o 14-dniową obserwację. Globalna analiza przeprowadzona na podstawie danych ankietowych umożliwiła wytypowanie potencjalnych zmiennych, które mają wpływ na podstawowy parametr różnicujący badane grupy, jakim jest spektrum autyzmu. Wśród badanych czynników określono również te, które wpływają na mikrobiom.

Uzyskane wyniki zostały opracowane z użyciem adekwatnych narzędzi, opisane i zobrazowane w sposób, który umożliwia ich łatwy odbiór i zrozumienie. Pomimo tak ogromnej liczby otrzymanych wyników, Doktorantka uniknęła tzw. szumu informacyjnego, udowadniając w opisie wyników, że oznaczenie każdego z parametrów zostało świadomie zaplanowane w celu uzyskania niezbędnej informacji.

W kolejnym rozdziale jakim jest Dyskusja wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały rzeczowo skonfrontowane na tle danych z piśmiennictwa. Zarówno sposób prezentacji uzyskanych wyników jak i zawarta w Dyskusji wnikliwa analiza wyników połączona z ich weryfikacją w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe podkreśla naukową dojrzałość Doktorantki. Wartym podkreślenia jest również fakt, iż Doktorantka zdaje sobie w pełni sprawę

z ograniczeń jakimi obarczone są badania prowadzone w tej tematyce i sama wskazuje na konieczność prowadzenia dalszych analiz w celu weryfikacji dokonanych obserwacji.

Interpretacja wyników i odniesienie ich do aktualnego stanu wiedzy pozwoliły na sformułowanie aż 10 wniosków, stanowiących bardziej podsumowanie pracy. Tutaj na marginesie drobna uwaga techniczna, że Wniosek 7 stanowi powtórzenie Wniosku 6.

Główne informacje zawarte we Wnioskach wskazują, że:

1. Doktorantka potwierdziła większą częstość występowania ASD u chłopców.
2. Wykazała, że dzieci z ASD wykazują tendencję do częstszego występowania problemów związanych z żywieniem oraz funkcjonowaniem układu pokarmowego.
3. Zaobserwowała zwiększoną częstość chorób przewlekłych oraz zaburzeń neurologicznych, zarówno w przypadku dzieci z ASD, jak i ich neurotypowego rodzeństwa.
4. Zaobserwowała wzorce żywieniowe, mogące oddziaływać na występowanie objawów ASD, w tym częstsze wprowadzanie diety eliminacyjnej oraz suplementacji u dzieci z ASD.
5. Doktorantka nie wykryła istotnych statystycznie różnic w stężeniach krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych.
6. Wykazała większą różnorodność mikrobioty neurotypowego rodzeństwa niż dzieci z ASD względem grupy kontrolnej.
7. Również w przypadku obfitości wybranych taksonów zaobserwowała większe różnice pomiędzy grupą neurotypowego rodzeństwa i kontrolą, niż ASD i kontrolą.
8. W analizie różnic na poziomie taksonomicznym rodzaju wykazała różnice w obfitości 53 taksonów bakteryjnych pomiędzy ASD i kontrolą, w tym dla mikroorganizmów istotnych metabolicznie.

Analizując Wnioski sformułowane przez Doktorantkę nasuwa mi się refleksja, że stanowią one zwarte podsumowanie wyników, a nie zasadniczą konkluzję będącą refleksją z analizy uzyskanych danych. Zredukowanie liczby Wniosków (np. połączenie 1 z 6/7 oraz 4 z 5) i skrócenie ich opisowego charakteru pozwoliłoby uwypuklić najważniejsze osiągnięcia tej pracy doktorskiej.

Jednocześnie, bardzo proszę Doktorantkę o szczególne ustosunkowanie się do wyników, do których odnosi się Wniosek 9 i 10. Najbardziej zaskakująca wydaje mi się największa różnorodność alfa i równomierność taksonów w grupie neurotypowego rodzeństwa.

tel. +48 42 635 43 36

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

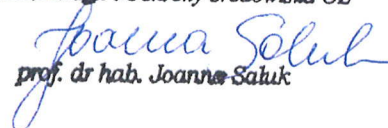
e-mail: joanna.saluk@biol.uni.lodz.pl

Przechodząc do podsumowania, w ocenie merytorycznej zamierzonych celów pracy należy podkreślić wysmienicie zaplanowany i przemyślany proces badawczy oraz istotne znaczenie osiągnięć. Realizacja pracy oraz sposób opracowania uzyskanych danych wskazuje, że Doktorantka dysponuje dobrym warsztatem badawczym umożliwiającym realizowanie eksperymentów naukowych na światowym poziomie. Przedstawione wyniki stanowią oryginalny wkład do nauki i otwierają dalsze interesujące obszary badawcze. Całościowo opracowane dzieło wskazuje, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę w dyscyplinie naukowej stanowiącej przedmiot Jej zainteresowania.

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pani mgr Pauliny Marii Żebrowskiej-Róžańskiej nt.: „Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu” posiada wysoką wartość poznawczą i bez wątpienia spełnia warunki określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668). W związku z czym przekładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Pauliny Marii Żebrowskiej-Róžańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy dysertacji oraz znaczące osiągnięcia wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
KATEDRY BIOCHEMII OGÓLNEJ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UE


prof. dr hab. Joanna Saluk