



Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 37 56 290

Wrocław, 2023-02-08

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Szymczaka

pt.: „Wirusowe i bakteryjne składniki mikrobiomu ludzkiego: profilowanie w wybranych stanach chorobowych przewodu pokarmowego”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandra Szymczaka napisana jest w języku angielskim pod oryginalnym tytułem „*Viral and bacterial components of the human microbiome: profiling in selected gastrointestinal disease states*”. Praca została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej oraz prof. dr hab. Wojciecha Witkiewicza, i we współpracy z Ośrodkiem Badawczo-Rozwojowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu.

Praca z zakresu metagenomiki, mikrobiologii oraz medycyny poświęcona jest nowatorskim badaniom nad zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w analizach składu ludzkiego mikrobiomu żołądka i jego korelacji z diagnozowanymi jednostkami chorobowymi. Dodatkowo przy użyciu technik NGS podjęto starania identyfikacji czynników genetycznych, które predysponują mikrobiom do kształtowania się w określony sposób, a tym samym do występowania określonych chorób przewodu pokarmowego.

Doktorant był uczestnikiem programu „BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”, a jego badania finansowano z projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS 15 UMO-2018/29/B/NZ6/01659.

Wyniki przedstawione w rozprawie były prezentowane na jednej krajowej i trzech międzynarodowych konferencjach naukowych, a część rezultatów opublikowano w pracy Szymczak *et al.*, *Application of 16S rRNA gene sequencing in Helicobacter pylori detection*. *PeerJ*. 2020 May 13;8:e9099. doi: 10.7717/peerj.909.



Tematyka rozprawy doktorskiej wpisuje się w aktualne trendy naukowe, ponieważ prowadzone obecnie badania oparte są w większości na zastosowaniu coraz bardziej dostępnej technologii sekwencjonowania NGS. Jest to w głównej mierze wykorzystywane do badań metagenomicznych analizujących skład, zmienność, interakcje w obrębie różnych ekosystemów i nisz ekologicznych, w tym ludzkiego mikrobiomu. Z punktu widzenia mikrobiologa, technika NGS pozwala na poszukiwanie i identyfikację mikroorganizmów, w tym tych, dla których nie ma możliwości hodowli przy użyciu klasycznych metod.

Omówienie elementów rozprawy doktorskiej

Wstęp pracy zwarty na 25 stronach, został przygotowany w logicznym porządku z omówieniem wszystkich kluczowych elementów aktualnej wiedzy na temat dostępnych technik sekwencjonowania, w tym NGS. Szkoda, że w tej części nie znalazły się poglądowe ryciny wyjaśniające techniczne aspekty, zalety i ograniczenia poszczególnych metod.

Moje pierwsze pytanie:

1. *Jaka technika NGS wg Pana jest najbardziej przydatna i efektywna w badaniach metagenomicznych? Jaka ma największą przyszłość ze względu na cechy technologiczne i cenowe?*

Druga część wstępu poświęcona była różnorodności mikrobiomu człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem układu pokarmowego i żołądka. Na koniec omówiono schematycznie potencjalny wpływ różnych typów ludzkiego genomu na profile mikrobiomu człowieka. I w tym wypadku bardzo pomocne byłyby schematyczne ryciny obrazujące idee bioróżnorodności oraz interakcji zwrotnych mikroorganizmy-człowiek.

Wiadomo, że skład, liczebność i aktywność metaboliczna poszczególnych elementów mikrobiomu ma wpływ na kondycję zdrowotną człowieka. Z drugiej strony badania sugerują, że obecność określonych alleli w genomie gospodarza może wpływać na preferencję kolonizacji poszczególnych składników ludzkiego mikrobiomu. Idąc tym tropem identyfikacja profili genetycznych człowieka może pomóc w predykcji składu mikroorganizmów, a w konsekwencji występowania określonych chorób. W przyszłości wczesna diagnostyka genetyczna może pozwolić na zapobieganie określonym stanom chorobowym. Znalezienie powiązań między różnymi jednostkami chorobowymi, a wirusowymi i bakteryjnymi elementami mikrobiomu pozwoliłoby na szybszą identyfikację przyczyny i dobór leczenia dla pacjentów.



Cel pracy, choć pominięty jako wydzielony rozdział rozprawy w wersji przesłanej do recenzji, obejmował zbadanie, czy obecność bakteryjnych i wirusowych elementów mikrobiomu żołądka ma związek z rozpoznawanymi jednostkami chorobowymi oraz czy skład mikrobiomu koreluje z profilami genetycznymi znajdującymi się w ludzkim genomie. Drugi element dotyczył weryfikacji, czy obecność określonych alleli w ludzkim genomie ma związek z rozpoznaniem określonych chorób przewodu pokarmowego.

Rozdział (Materials) zawarty w sumie na 22 stronach rozprawy opisywał zarówno użyte materiały, jak i zastosowane metody. Pomimo szczegółowych opisów, trudno było się zorientować jak wyglądała cała procedura. Bardzo pomocny byłby schemat przedstawiających całość procesu badawczego od pobrania próbki (próbek) poprzez poszczególne procedury izolacji DNA do sekwencjonowania i dobór analiz danych dla każdej grupy genetycznej (bakterie, wirusy, człowiek).

W obecnej formie rozdział jest poukładany według rodzaju metodologii, a nie ciągu logicznego np. analiza DNA fagowego; analiza DNA bakteryjnego; analiza DNA ludzkiego.

Moje pytanie:

2. *Dla jakich bibliotek DNA stosowano metodę Ion Torrent Sequencing a dla jakich Illumina? I dlaczego?*

Rozdział wyniki zamieszczony na 32 stronach w trzynastu podrozdziałach oraz **Dyskusję** przedstawioną na 20 stronach omówię łącznie. Choć w obszernej dyskusji poświęcono wiele miejsca na przedstawienie możliwych skutków i przyczyn obserwowanych zależności, będę miała parę pytań szczegółowych z prośbą o wyjaśnienia.

Materiał w postaci biopłatów części odźwiernikowej żołądka oraz próbki krwi pobierane były od pacjentów Pracowni Endoskopii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego. Próbki izolowanego DNA zostały sekwencjonowane techniką NGS, a dane ze wszystkich rodzajów testów ustandaryzowane i poddane analizie statystycznej. Analizy korelacji składu mikrobiomu versus zdiagnozowane jednostki chorobowe zamieszczono w paragrafie 10.5.1. Według Tabeli 11, Specyficzne zaburzenia zdrowotne według klasyfikacji ICD10, w tym K29 – “Gastritis and duodenitis, K21 – “Gastro-oesophageal reflux disease” korelowały z bakteryjnymi składnikami mikroflory żołądka, w tym *Escherichia albertii* w obu przypadkach, ale w ogóle nie wykazano związku z *Helicobacter pylori*.



Pytanie:

- 3. Jak Doktorant może wyjaśnić rozbieżności z danymi literaturowymi dla *H. pylori*?*

W analizie statystycznej komponentów bakteriofagowych (Tabela 12) wykazano zależność występowania z jednostkami chorobowymi dla fagów z grup profagów Clostridioides, Tequatrovirus oraz Inovirus.

Pytanie:

- 4. Czy metadane pozwoliły skorelować te grupy fagów z występowaniem ich żywicieli, zwłaszcza w odniesieniu do profagów i Inovirus?*

W kolejnej analizie stwierdzono, że obecność sifowirusów Brussowvirus i Triavirus w ludzkim mikrobiomie korelowała ze znacznie zmniejszoną różnorodnością bakteryjną.

Pytanie:

- 5. Czy była to korelacja ogólna, czy dotyczyła szczególnie grupy *Streptococcus sp.* i *Staphylococcus sp.*, dla których te fagi są specyficzne?*

Analiza korelacji (Rycinie 16 i 17) wykazała, że fagomy pacjentów z chorobami przewlekłymi (cukrzyca i nadciśnienie) mają znacząco inny skład niż fagomy osób zdrowych, podczas gdy nie było znaczących różnic między składem bakteryjnym.

Pytanie:

- 6. Jak Doktorant może wyjaśnić taki wynik?*

Druga część doktoratu poświęcona była określeniu korelacji pomiędzy polimorfizmem pojedynczych nukleotydów (single-nucleotide polymorphism, SNP) w genach zaangażowanych we wrodzoną odpowiedź immunologiczną a zmianami mikrobiomu.

Oczywistym jest, że obecność określonych bakteriofagów lub taksonów bakteryjnych wiąże się z różnorodnością bakterii w mikrobiomach. Również obecność bakterii związanych z zapaleniem błony śluzowej żołądka ma swoje powiązania z niektórymi ludzkimi genotypami. Dlatego Doktorant starał się odpowiedzieć na pytanie czy możemy doszukać się trójstronnych korelacji człowiek-bakteria-fag, oraz czy fagi mogą służyć jako indykatory do predykcji rozwoju jednostek chorobowych, podobnie do bakterii. Czy znając profil SNP pacjenta możemy przewidzieć rozwój określonych schorzeń, w tym wypadku przewodu pokarmowego?



Badano współistnienie SNP w genach odpowiedzialnych za wrodzoną odpowiedź immunologiczną z występowaniem określonych bakteriofagów i zależności znaleziono dla kilku grup: Kayvirus, Punavirus, Lambdavirus, oraz Teseptimavirus. Natomiast taka sama analiza, ale trójstronna z uwzględnieniem dodatkowo bakteryjnych gospodarzy wykazała zbieżność jedynie dla Kayvirus and Punavirus.

Pytanie:

7. *Jak wyjaśnić te różnice? Czy profile genetyczne mogą mieć wpływ na kolonizację i bioróżnorodność fagomu niezależnie od obecności ich gospodarzy?*

Zakładano, że obecność specyficznych alleli w genach może promować wzrost bakterii poprzez upośledzenie funkcji wrodzonego układu odpornościowego. Stwierdzono, iż trzynaście pojedynczych mutacji nukleotydowych, jest powiązane ze statystycznie istotnymi zmianami w różnorodności mikrobiomu. Analizowano również związek między profilami genetycznymi a występowaniem specyficznych patogenów dla nieżytu żołądka i znaleziono pozytywną korelację dla *H. pylori*, *Rothia mucilaginosa*, *Prevotella melaninogenica*, *Neisseria subflava* i *Prevotella jejuni*. Przewidywano zależności dla każdego patogenu osobno, ale wniosek ogólny był taki, że profil SNP może wpływać na skład mikrobiomu i predysponować określone gatunki do namnażania, a w konsekwencji prowadzić do dysbiozy i rozwoju stanów chorobowych.

Pytanie:

8. *Czy można wymienić kilka wspólnych profili SNP, które wyjątkowo predysponują do kolonizacji patogenami odpowiedzialnymi za gastritis? Czy obserwowano infekcje mieszane wraz z korelacją SNP?*

W Dyskusji Doktorant stwierdza, że można zaobserwować trójstronne współzależności między ludzkimi składnikami mikrobiomów gospodarza, bakteriami i bakteriofagami, a także ich powiązania ze stanem zdrowia człowieka. Jednak zarówno bakteryjny, jak i wirusowy skład ludzi nie jest z góry określony przez ich czynniki genetyczne. A opisana relacja jest również podatna na czynniki zewnętrzne.



Wnioski zostały przedstawione w ośmiu punktach, które podsumowały najważniejsze konkluzje wyciągnięte z tego wielowątkowego i trudnego do jednoznacznej interpretacji projektu. Aktualnie ukazują się coraz więcej prac dotyczących badań metagenomicznych oraz analiz korelacji predyspozycji genetycznych versus mikrobiom, w aspekcie predykcji i diagnostyki różnych schorzeń, w tym układu pokarmowego.

Mam zatem prośbę do Doktoranta o zwięzłe przedstawienie elementu nowości, jaki udało się odkryć, czy przeanalizować w prezentowanej pracy. Można ten element włączyć do prezentacji przygotowywanej do obrony.

Co do formalnej strony dysertacji, Doktorant przygotował pracę w języku angielskim z układem i sposobem prezentacji powszechnie przyjętym dla monograficznych prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 150 stron i podzielona jest na poszczególne rozdziały: spis treści, spis tabel, rycin i skrótów, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz bibliografię zawierającą powyżej 280 anglojęzycznych pozycji literaturowych. Praca jest zorganizowana adekwatnie do prezentowanych treści. Zabrakło jednak osobno wydzielonego rozdziału: cel i założenia pracy. Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym.

Podsumowanie rozprawy doktorskiej

Podsumowując przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pana mgr Aleksandra Szymczaka, przyznaję, że Doktorant wykonał ciekawą pracę badawczą, czego dowodem jest z sukcesem opublikowany artykuł w czasopiśmie PeerJ z listy Journal Citation Reports, o współczynniku oddziaływania (*IF 3,061; 100 punktów MEiN*).

Rozprawa została napisana przejrzyście pod względem edytorskim i językowym. Pan mgr Aleksander Szymczak wykazał się dużymi umiejętnościami stosowania metod badawczych głównie w zakresie nowoczesnych technik sekwencjonowania, metagenomiki oraz analiz bioinformatycznych. Poza tym na uwagę zasługuje realizacja pracy opartej na trudnym do uzyskania materiale jakim są próbki kliniczne pobierane od pacjentów w trakcie zabiegów inwazyjnych - gastrokopii. Zebranie odpowiednio dużej puli prób w celu uzyskania sensownych analiz statystycznych wymagało ciężkiej pracy oraz perfekcyjnego zgrania pracy całego zespołu ludzi. Chciałabym ze swojej strony pogratulować doktorantowi niebywałej wytrwałości w opracowaniu materiału klinicznego, które obejmowało zabezpieczenie

materiału, skomplikowane procedury izolacji DNA, tworzenie bibliotek, techniki sekwencjonowania NGS, i na koniec wymagało żmudnych analiz bioinformatycznych i statystycznych na ogromnych bazach uzyskanych danych.

W mojej ocenie Kandydat wykazał się dużą dojrzałością naukową przy opracowaniu obszernej dysertacji w języku angielskim posiłkując się najnowszą literaturą z dziedziny. Na uznanie zasługuje również zaangażowanie Doktoranta w realizację projektu badawczego w ramach funduszy OPUS 15, aktywne uczestnictwo w konferencjach międzynarodowych i opublikowanie wyników w prestiżowym czasopiśmie. Wszystko to idealnie wpisuje się w założenia Programu Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii (BioTechNan).

Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedkładam na ręce Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandra Szymczaka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandra Szymczaka odpowiada wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.).

W mojej ocenie praca doktorska Pana mgr Aleksandra Szymczaka zasługuje na wyróżnienie, dlatego niniejszym składam taki wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
KIEROWNIK



prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa

