

Warszawa, 18 .11.2017

Prof. dr hab. Przemysław Juszczynski
Z-ca Dyrektora ds. Nauki
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Indiry Gandhi 14
Warszawa 02-776

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Żeber-Lubeckiej

„Metagenomika 16S rRNA w analizie profili bakteryjnych stolca na przykładzie dzieci przedwcześnie urodzonych, dorosłych z zespołem jelita nadwrażliwego oraz otyłych myszy”

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorantka podejmuje się oceny zmienności profili bakteryjnych flory jelitowej w oparciu o trzy modele eksperymentalne, wykorzystując do badań technologię masywnie równoległego sekwencjonowania podjednostki 16S bakteryjnego rRNA.

Technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS) stała się narzędziem powszechnie wykorzystywanym przez mikrobiologów. Analiza genomyczna populacji mikroorganizmów środowiskowych, czyli metagenomika, pozwala na charakterystykę danego mikrobiomu pod kątem genetycznym i daje podstawę do dalszych analiz filogenetycznych i funkcjonalnych. W ostatnich latach ta interdyscyplinarna dziedzina z pogranicza mikrobiologii i genomiki, podążając za możliwościami, jakie daje rozwój technik masywnie równoległego sekwencjonowania, rozwija się wyjątkowo intensywnie, dostarczając dowodów na nieoczekiwane związki między składem, zmiennością i różnorodnością flory bakteryjnej jelit a patologiami człowieka. Wykazano

związek między zaburzeniami w składzie mikroflory a występowaniem nie tylko chorób samych jelit, ale chorób metabolicznych, nowotworami, a nawet odpowiedzią na leki immunomodulujące. Skład mikroflory jelitowej u biorców allogenicznych przeszczepów komórek krwiotwórczych wykazuje związek z prawdopodobieństwem wystąpienia powikłań takich jak GVHD – wykazano, że u chorych z ostrym GVHD dochodzi do zaburzeń w proporcji ilości bakterii typu *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Te obserwacje budzą nadzieje, że poprzez modulację składu mikroflory – na przykład poprzez suplementację probiotyków, lub przeszczepy flory bakteryjnej – będziemy w stanie wpływać na prawdopodobieństwo wystąpienia tych powikłań.

Diagnostyczne i kliniczne wykorzystanie tej technologii i wymaga standaryzacji metod. Do dziś takiego metodycznego consensusu nie ma. W swojej rozprawie doktorskiej, Pani mgr inż. Natalia Żeber-Lubecka zajmuje się oceną użyteczności badań metagenomicznych w analizie zmian profili bateryjnych bakterii jelitowych człowieka i myszy z użyciem sekwencjonowania masowego, w oparciu o badania wykonane na trzech modelach: niemowlątach urodzonych przedwcześnie, chorych z zespołem jelita drażliwego i modelu mysim otyłości indukowanej dietą. Cel pracy jest zatem odpowiedzią na realne i dotychczas nierozwiązane potrzeby naukowej społeczności.

Rozprawa przedstawiona mi do oceny posiada konstrukcję typową dla prac doktorskich i obejmuje wstęp, przedstawienie celów pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję, podsumowanie oraz wnioski. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz użytych skrótów i 164 pozycje piśmiennictwa (w większości bardzo aktualne – z lat 2014-17). Autorka przedstawia ponadto listę pełnotekstowych publikacji zawierających wyniki przedstawione w rozprawie. Pracę kończy spis tabel i rycin.

Logiczna, wyczerpująca a zarazem jasna struktura i tekst wstępu wskazują na uporządkowaną wiedzę Autorki oraz umiejętność jej przedstawienia w sposób czytelny. Autorka we wstępie przedstawia wyzwania metagenomiki i stan badań dotyczący wpływu mikroflory jelitowej na patologie jelit u wcześniaków, IBD i otyłości. W kolejnym rozdziale mgr inż. Natalia Żeber-Lubecka przedstawia cele pracy. Podstawowym celem, jaki Autorka przyjęła, była ocena użyteczności badań metagenomicznych w analizie zmian profili bateryjnych bakterii jelitowych człowieka i myszy z użyciem sekwencjonowania masowego na przykładzie badań:

1. rozwoju mikrobiomu jelitowego u dzieci przedwcześnie urodzonych;
2. zmian mikrobiomu jelitowego u chorych z zespołem jelita drażliwego;
3. modyfikacji mikrobiomu jelitowego w mysim modelu otyłości.

Do tak sformułowanego celu pracy mam pewne zastrzeżenia. Otóż w mojej opinii – cel pracy powinien stanowić testowalną hipotezę, którą można przyjąć lub odrzucić posługując się mierzalnymi wskaźnikami. Innymi słowy – jakie warunki brzegowe autorka przyjęła, by uznać, że metoda jest użyteczna, a jakie – że nie jest?

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka przedstawia laboratoryjne procedury badawcze. Metodyka jest dobrze dobrana do celów pracy. W tej części pracy zdecydowanie brakuje jednak kilku elementów:

1. Przedstawienia definicji i sposobu obliczania indeksów, którymi posługuje się autorka (Indeks Chao1, Simpsona). Autorka wprawdzie podaje ich ogólną definicję dalej w tekście, np. na str. 52 i 53 w rozdziale Wyniki, ale nie przedstawia sposobu ich obliczania.
2. Przedstawienia metodyki badań funkcjonalnych szlaków metabolicznych bakterii w IBS.

W kolejnym rozdziale Doktorantka logicznie przedstawia uzyskane wyniki, zestawiając je w formie rycin, tabel i wykresów. Trudno czytelnikowi zrozumieć dość nieortodoksyjne podejście do ich numeracji – nie w sposób narastających liczb naturalnych, a kombinacji liczb i indeksów.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka krytycznie analizuje dostępne dane literaturowe i przedstawia interpretację własnych wyników, podsumowuje uzyskane wyniki i wyciąga wnioski:

1. Sekwencjonowanie masowe sześciu hiperzmiennych regionów bakteryjnego genu 16S rRNA stanowi nową metodę analizy profili bakteryjnych stolca o możliwościach badawczych trudnych do przecenienia;
2. Porównywanie wyników badań metagenomicznych uzyskiwanych w różnych zespołach może być utrudnione, szczególnie w analizach dyskretnych zmian profili bakteryjnych, co powinno skłonić do przyjęcia przez badaczy ujednoliconego, powszechnie akceptowanego protokołu badawczego.

Przytoczone wnioski – a w szczególności wniosek pierwszy – stanowią subiektywną ocenę uzyskanych wyników, trudną do zweryfikowania w oparciu o mierzalne wskaźniki. Taki wniosek jest konsekwencją nie do końca poprawnego, w moim przekonaniu, postawienia celu pracy, o czym pisałem powyżej. W mojej ocenie, w naukowym dyskursie powinno się unikać tego typu subiektywnych sformułowań („trudny do przecenienia”). Czy autorka mogłaby zaproponować lub przedstawić mierzalne narzędzia, które pozwoliłyby ocenić wartość sekwencjonowania 16S rRNA? Być może należałoby przerehabilitować również cel pracy? Proszę o ustosunkowanie się Doktorantki do tych uwag w trakcie dyskusji.

Streszczenia, zarówno w języku polskim, jak i w języku angielskim, właściwie prezentują najważniejsze zagadnienia poruszane w rozprawie. Praca została przygotowana bardzo starannie pod względem językowym, stylistycznym i redaktorskim.

Oprócz tych wymienionych powyżej najistotniejszych uwag, chciałbym prosić Doktorantkę o odpowiedzi na następujące pytania:

1. Wykres 1W (str. 35) i przedstawione w nim wyniki są w mojej ocenie niejasne. Jakie różnice ilustruje ten wykres? Jak je mierzono? (brak informacji na ten temat w sekcji Materiały i Metody)
2. Strona 39, wers 2/3 od góry – co autorka rozumie pod pojęciem „zdrowych kontroli”? Z opisu przedstawionego w sekcji „Materiały i metody” wynika, że w badaniu były tylko zdrowe wczesniaki.
3. W którym dniu/tygodniu po urodzeniu rozpoczęto suplementację preparatem probiotycznym? Punkt 0 na wykresach jest zdefiniowany jako moment przed podaniem probiotyku, ale nie jest jasne, w jakim czasie po urodzeniu to nastąpiło. Czy w tym zakresie porównywane grupy były homogenne? Czy ew. różnice mogły wpłynąć na ostateczne wnioski?
4. Z jakiego powodu do oceny bioróżnorodności Autorka wybrała indeks Simpsona, a nie inne stosowane indeksy? Czy stosowanie innych indeksów wpłynęłoby na wyciągnięte wnioski?

Pomimo sformułowanych powyżej uwag i pytań, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi ciekawe, samodzielne, oryginalne i szerokie opracowanie naukowe. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki zostały przedstawione w 3 publikacjach pełnotekstowych; w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszą autorką, a w jednej trzecią. Wszystkie publikacje pochodzą z recenzowanych czasopism. De facto – autorka, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa - mogła wykorzystać swoje prace do przygotowania rozprawy doktorskiej w oparciu o cykl publikacyjny.

W ocenie Recenzenta, praca nie budzi większych zastrzeżeń merytorycznych. Uwagi przedstawione powyżej nie dotyczą warstwy merytorycznej pracy. Przedstawiona do recenzji praca jest oryginalnym i samodzielnym opracowaniem naukowym, a przytoczone powyżej uwagi mogą stanowić przyczynek do dyskusji z Doktorantką. Rozprawa z pewnością odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Wierzę, że przedstawiona powyżej argumentacja stanowi wystarczające uzasadnienie do przedstawienia Wysokiej Radzie Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego wniosku o dopuszczenie mgr Natalii Żeber-Lubeckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,

