



Warszawa 28.12.2017

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej
Centrum Onkologii-Instytut,
ul. Wawelska 15B, 02-034 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

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

Autor: *mgr Natalia Żeber-Lubecka*

Wstęp

Przedstawiona mi do recenzji praca ma przede wszystkim charakter czysto metodyczny, chociaż uzyskane wyniki, dla trzech różnych grup badanych, mają również wartość poznawczą i stanowią o przydatności zarówno zastosowanej metodyki, jak i poszerzają zakres wiedzy na temat współistnienia i współzależności między genomem gospodarza a bakteriomem współtworzącym skomplikowany zespół współzależności metabolicznych. W pracy analizowano rozwój i skład bakteriomu w czasie w grupie noworodków urodzonych przedwcześnie, suplementowanych i niesuplementowanych probiotykami, dorosłych chorych z zaparciową i niezaparciową postacią zespołu jelita wrażliwego. Trzecią grupę stanowiły otyłe myszy na diecie wysokotłuszczowej i wysokocukrowej suplementowane stolcem myszy chudych. We wszystkich przypadkach do badania pobierano próbki stolca, z którego izolowano DNA. Takie DNA poddawano amplifikacji ze starterami obejmującymi gen 16S rRNA. Gen ten cechuje duża zmienność pozwalająca na przeprowadzenie analizy filogenetycznej. Analiza dokonywana jest w oparciu o dane zebrane za pomocą sekwencjonowania następnej generacji. Analiza regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA jest jednym z najbardziej użytecznych narzędzi pozwalających na identyfikację drobnoustrojów.

Ocena merytoryczna pracy

Celem tej pracy była ocena przydatności badań metagenomicznych w analizie zmian profili bakteryjnych bakterii jelitowych człowieka i myszy z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji.

Badania prowadzące do charakterystyki filogenetycznej szczepów bakteryjnych autorka wykonywała analizując za pomocą sekwencjonowania nowej generacji regiony hiperzmiennie bakteryjnego genu 16S rRNA. Regiony te cechuje duża zmienność pozwalająca na ocenę zarówno zmienności gatunkowej, jak i wewnątrzgatunkowej.

Najogólniej rzecz ujmując doktorantka opracowała metodę i potwierdziła jej przydatność do analizy filogenetycznej bakteriomu koegzystującego w organizmie gospodarza. Wykazała, że metagenomika jest metodą pozwalającą na identyfikację profili bakteryjnych zarówno żyjących na powierzchni organizmu, jak i w jego wnętrzu. Kwestią wyboru pozostaje źródło bakteriomu. Dzięki zastosowaniu programów statystycznych udało się zidentyfikować określone szczepy bakteryjne, a nawet w obrębie określonych szczepów mniejsze jednostki taksonomiczne.

Do najciekawszych wyników tej pracy należy wykazanie różnic w składzie ilościowym bakteriomu u noworodków przedwcześnie urodzonych naturalnie i przez cesarskie cięcie w chwili porodu, jak i w dwa tygodnie po porodzie. Chociaż autorce nie udało się uzyskać danych potwierdzających znamienność statystyczną obserwowanych różnic z powodu dużej zmienności międzyosobniczej, to jednak z przedstawionych danych wynika, że skład bakteriomu przynajmniej w początkowym okresie życia noworodka jest związany ze sposobem przyjścia na świat. Swoją drogą ciekawe byłoby badanie zależności składu mikrobiomu w zależności od bakteriomu sali porodowej lub może inaczej - w zależności od tego, czy poród odbywałby się w sali porodowej szpitala (teoretycznie warunki aseptyczne), czy w warunkach domowych.

Kolejnym, raczej niespodziewanym, wynikiem jest wykazanie braku istotnych statystycznie różnic pomiędzy składem bakteriomu jelitowego osób zdrowych grupy kontrolnej i osób chorych

na zespół drażliwego jelita, niezależnie od podtypu tej choroby. Obserwowane zmiany miały raczej dyskretny charakter i cechowało je duże międzyosobnicze zróżnicowanie. Zastosowanie antybiotykoterapii w postaci podawania rifaksyminy znacząco obniżało skład bakteriomu jedynie u pacjentów, u których notowano złagodzenie dolegliwości pod wpływem zastosowanego leczenia. Brak istotnych różnic w dominujących szczepach bakteryjnych między chorymi i zdrowymi, a także reakcja na antybiotykoterapię jedynie u tych chorych, którzy odnoszą korzyść z tego typu terapii sugeruje, że prawdopodobna odpowiedzialność za zespół drażliwego jelita może być związana z tymi szczepami, które są w mniejszości, ale które reagują na antybiotykoterapię. Niewątpliwie może temu sprzyjać bogactwo gatunkowe bakterii jelitowych w grupie pacjentów z zespołem drażliwego jelita, które jak to wykazała autorka, jest znacząco wyższe niż u zdrowych z grupy kontrolnej. Trzeba jednak pamiętać, że co najmniej dwa czynniki utrudniają wyciąganie ostatecznych wniosków dotyczących powiązań między bakteriami jelitowymi a zespołem drażliwego jelita, a nawet jego podtypami. Po pierwsze duże zróżnicowanie osobnicze w typach i podtypach bakterii jelitowych. Doktorantka zidentyfikowała we wszystkich próbkach cztery główne typy bakterii, ale w różnych próbkach obserwowano dodatkowo większe zróżnicowanie, a w jednej próbce zidentyfikowano nawet 26 różnych typów bakterii. Kolejnym czynnikiem są różnice metodyczne wynikające z faktu sekwencjonowania różnej ilości hiperzmiennych regionów 16S rRNA, co ma w oczywisty sposób przełożenie na ocenę złożoności bakteriomu.

Tworzenie modeli zwierzęcych chorób ludzkich ułatwia zrozumienie ich podłoża molekularnego i genetycznego oraz umożliwia testowanie leków przed wprowadzeniem ich do badań przedklinicznych i badań pierwszej fazy na ludziach. To powód, dla którego modele te powinny w jak najlepszy sposób odzwierciedlać przebieg choroby u ludzi. Doktorantka postanowiła przetestować, czy wykorzystując model charakteryzujący mikrobiom bakteryjny u myszy może zaobserwować różnice pomiędzy zwierzętami otyłymi i o prawidłowej wadze. Model mysiej otyłości jest bowiem powszechnie stosowany w badaniach nad wpływem otyłości na rozwój chorób

cywilizacyjnych. Wynik analizy stolca myszy na diecie wysokotłuszczowej i normalnej wykazał brak istotnych zmian w składzie bakteriomu pomiędzy myszami otyłymi i kontrolnymi. Doktorantka odnotowała jednak istotne różnice w liczebności co najmniej sześciu rodzin. Ciekawym i istotnym wynikiem było wykazanie, że transfer mikrobiomu myszy na diecie normalnej do myszy otyłych będących na diecie wysokotłuszczowej powodował znaczący statystycznie wzrost zarówno różnorodności gatunkowej, jak i bogactwa u myszy na diecie wysokotłuszczowej. Suplementacja 28. tygodniowym stolcem myszy szczupłych myszy otyłych na diecie wysokotłuszczowej powodowała dalszy wzrost ich otyłości.

Dyskusja poprowadzona na dziewięciu stronach maszynopisu ma bardzo wnikliwy charakter. Składa się jakby z trzech niezależnych części podsumowujących obserwacje z każdego z badanych modeli. Otrzymane wyniki porównane są z danymi literaturowymi. Całość dyskusji kończy się trzypunktowym podsumowaniem zawierającym najważniejsze merytoryczne obserwacje. Praca kończy się dwoma ogólnymi wnioskami stanowiącymi odpowiedź na stawiane w celu pracy pytanie o przydatność opracowanej przez doktorantkę metodyki do analizy profili bakteryjnych w oparciu o sekwencjonowanie masowe sześciu hiperzmiennych regionów bakteryjnego 16S rRNA. Wynika z nich jednoznacznie, że wykorzystanie do analizy sześciu hiperzmiennych obszarów pozwala w sposób jednoznaczny przeprowadzić analizę genomów bakteryjnych.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska, włącznie ze spisem literatury liczy 94 strony. Ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora. Składa się ze Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenia, Celu pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji i Wniosków, Wykazu opublikowanych prac, w których zawarte są wyniki tego doktoratu. Całość pracy poprzedzona jest spisem stosowanych skrótów. Wykaz piśmiennictwa liczy 164 pozycje. Do pracy dołączony jest

aneks w którym zawarty jest spis rycin, tabel i wykresów. Na podkreślenie zasługuje bardzo staranne graficzne opracowanie tekstu i bardzo mała liczba błędów literowych.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że mgr Natalia Żeber-Lubecka osiągnęła stawiane sobie cele. Opracowała metodę pozwalającą na identyfikację rodzaju i/lub gatunku bakterii zasiedlających inne organizmy. Wykorzystanie tej metody pozwala na ocenę wpływu jaki te mikroorganizmy wywierają na organizm gospodarza. Ważnym elementem tej pracy jest podkreślenie braku wypracowanej jednolitej metodyki i co za tym idzie odwoływania się do danych pochodzących z różnych laboratoriów. Te dwa elementy stanowią o wadze tej pracy dla przyszłych badań nad oceną współzależności metabolicznych pomiędzy mikroorganizmami i organizmem gospodarza. Moim zdaniem rozprawa doktorska mgr Natalii Żeber-Lubeckiej odpowiada warunkom określonym w Art. 13. Ust 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o dopuszczenie autorki pracy mgr Natalii Żeber-Lubeckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na fakt opublikowania wyników tego doktoratu w trzech publikacjach w anglojęzycznych czasopismach naukowych, w tym dwóch w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym IF=5,78, wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.

p.o. KIEROWNIKA
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz A. Siedlecki