Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Samodzielna Pracownia Badań Biochemicznych

Ul. Broniewskiego 24, 71-460 Szczecin,

Tel: +48 (91) 441 48 08 ; fax. +48 (91) 441 48 07

Kierownik: dr hab. n. med. i zdr. Karolina Skonieczna-Żydecka,

Szczecin, 11.04.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej

Lek. Emilii Sawickiej - Śmiarowskiej

pt. „ Rola mikrobiomu w powstawaniu i progresji choroby niedokrwiennej serca", wykonanej w Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem

Prof. dr hab. Karol Adam Kamińskiego

Unikatowy zbiór drobnoustrojów zamieszkuje wybrane nisze ekologiczne w organizmie człowieka. Najbogatszy oraz najbardziej zróżnicowany jest ten zlokalizowany w przewodzie pokarmowym, zwłaszcza w jelicie grubym. Jest on często określany narządem bakteryjnym lub tzw. „narządem bez narządu („an organ without organ"). Biocenozę tę określono mianem mikrobioty jelitowej. Tworzą ją przede wszystkim bakterie, ale również grzyby, archeowce, wirusy i eukaryota. Dominujące typy bakterii tworzą Firmicutes (w najnowszej klasyfikacji taksonomicznej Bacillota) oraz Bacteroidetes (Bacteroidota), a kolejno Proteobacteria (Pseudomonadota) oraz Actinobacteria (Actinomycetota). Dzięki bakteriom jelitowym rozkładane są niestrawione składniki pokarmowe, a produkty tych przemian (między innymi krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe) odżywiają komórki jelita. Wybrane rodzaje bakterii jelitowych produkują też witaminy, głównie K oraz z grupy B, oraz zwiększają przyswajalność składników mineralnych z diety. Produkują też śluz i białka przeciwbakteryjne dzięki czemu chronią organizm przed inwazją patogenów, a wytwarzając określone enzymy uczestniczą w regulacji stężenia cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Bakterie jelitowe wchodzą w

nieustanne interakcje z układem immunologicznym człowieka, co jest niezbędne dla wytworzenia tolerancji immunologicznej wobec komensali oraz antygenów żywności. W przypadku zwiększonej przepuszczalności jelitowej antygeny znajdujące się w świetle jelita ulegają translokacji i aktywują GALT. Produkowane wówczas komórki efektorowe GALT oraz czynniki prozapalne, wywołują subkliniczny stan zapalny, który jedynie początkowo ogranicza się do przewodu pokarmowego. Jak dowodzi literatura naukowa, stan zapalny jest czynnikiem etiologicznym chorób serca i naczyń krwionośnych. Tak szerokie spektrum aktywności mikrobioty jelitowej sprawia, że właściwa jej kompozycja wpływa regulująco na ogólny stan zdrowia. Jednocześnie zaznaczyć należy, że skład mikrobioty ulega silnym i nieustannym fluktuacjom, przy czym wiek, płeć, czynniki genetyczne gospodarza, warunki środowiskowe i szeroko rozumiany styl życia – przede wszystkim dieta - odgrywają tutaj rolę priorytetową. Część z nich to także modyfikowalne czynniki ryzyka także chorób serca i naczyń co sprawia, że mikrobiota jelitowa – jak wspólny mianownik - może być nowym punktem uchwytu dla terapii ukierunkowanych na choroby układy krwionośnego lub posłużyć jako nowy obszar poszukiwania markerów diagnostycznych. W obliczu tych faktów, wybór tematu jakiego dokonała Doktorantka jest niezwykle ważny i innowacyjny, gdyż poszukiwanie markerów mikrobiotycznych to nowy, niezbadany obszar wiedzy, w którym interdyscyplinarność zespołu badaczy ma kluczowe znaczenie. Jest to również temat niezmiennie aktualny albowiem częstość rozpoznawania chorób serca systematycznie rośnie. Prace przygotowane przez Doktorantkę wraz z zespołem są konsekwentnie aktywnym wkładem w literaturę światową zogniskowaną na ustaleniu znaczników bakteryjnych ważnych w profilaktyce i przebiegu klinicznym chorób serca.

Ocena układu rozprawy doktorskiej i formalnej strony

Rozprawa doktorska Lek. Emilii Sawickiej-Śmiarowskiej przygotowana została jako cykl trzech prac, jednej oryginalnej i dwóch przeglądowych, opublikowanych w latach 2021-2022. Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MEiN. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla tych prac wynosi 12.203, a liczba punktów MEiN to 420. Praca oryginalna opublikowana została w 2022 roku w czasopiśmie *Journal of Clinical Medicine* (MNiSW: 140, IF: 4.242), dwie prace przeglądowe

zaś w *Nutrients* (MNiSW: 140, IF: 5.717) oraz *Journal of Clinical Medicine* (MNiSW: 140, IF: 4.242).

We wszystkich publikacjach składających się na cykl będący podstawą rozprawy, Doktorantka jest pierwszym autorem, a ponadto zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami, miała Ona wiodący udział w tworzeniu tych publikacji. We wszystkich pracach recenzowanego cyklu Doktorantka jest autorem koncepcyjnym i osobą, która opracowała oryginalne manuskrypty. Świadczy to o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, zwłaszcza w przypadku pracy oryginalnej. Nie jest to zaskakujące, albowiem jak wcześniej wspomniano, obszar badań nad mikrobiotą wymaga podejścia interdyscyplinarnego. Co godne podziwu, na wykonanie badań Doktorantka uzyskała dofinansowanie z Narodowego Centrum Nauki, w ramach grantu Preludium.

Układ rozprawy doktorskiej lek. Emilii Sawickiej-Śmiarowskiej jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Zeszyt opracowania przygotowano syntetycznie, systematycznie i przejrzyście. Wynika to z pewnością z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Recenzowana rozprawa doktorska składa się z czternastu rozdziałów. Są to: 1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską; 2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń; 3. Zestawienie publikacji doktoranta; 4. Wprowadzenie; 5. Cel pracy; 6. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską; 7. Wnioski; 8. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską; 9. Streszczenie w języku polskim; 10. Summary; 11. Piśmiennictwo; 12. Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej; 13. Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej; 14. Zgody Komisji Bioetycznej.

We wprowadzeniu Doktorantka wprowadza czytelnika w problematykę epidemiologii i przyczyn choroby niedokrwiennej serca, wskazując że jedną z kluczowych ról może odgrywać mikrobiota jelitowa. Kolejno przedstawia aktualnie najczęściej wykonywane metody analizy mikrobioty jelitowej. Prawidłowo formułuje cel główny i cele szczegółowe. W podrozdziałach omawia prace stanowiące cykl doktorski, w tym także – gdzie możliwe – omawia główne wyniki. W ostatnim podrozdziale prezentuje wnioski płynące z badań własnych.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

W pracach poglądowych Doktorantka przedstawiła zależności pomiędzy kompozycją mikrobioty jelitowej, a dietą i wybranymi (modyfikowalnymi i niemodyfikowalnymi) czynnikami ryzyka rozwoju serca i naczyń krwionośnych. W pierwszej pracy zanalizowała wzorce żywieniowe i podaż makro- i mikroskładników w odniesieniu do składu i funkcji mikrobioty jelitowej. W kolejnej pracy poglądowej - modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych - zestawiła z udziałem tychże w kształtowaniu wzorca mikrobiotycznego w przewodzie pokarmowym. Najciekawsze elementy obu prac to podrozdziały pn. „What does it mean for the heart", w których Doktorantka ekstrapoluje przytoczone wcześniej zmiany mikrobioty z fenotypem chorób serca. Rozdziały te są jasne, czytelne, napisane wzorcowym słownictwem naukowym, ale przede wszystkim pozwalają czytelnikowi – który nie zawsze musi być specjalistą mikrobiologiem – w zrozumieniu prezentowanych treści. Największą wartość poznawczą ma praca oryginalna, w której autorka technikami sekwencjonowania nowej generacji podjęła się poszukiwania mikrobiotycznych markerów rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Cele badania są jasne, metodyka opisana skrupulatnie. Co istotne, oprócz analiz NGS, rozdział wyniki uzupełniają badania metabolomiczne. Jest to niezwykle cenne, gdyż o ile mikrobiom jest zmienny osobniczo to jego aktywność metaboliczna pozostaje względnie stała. Poza tym, analizy PICRUSt1 pozwoliły przewidzieć metaboliczny potencjał mikrobiomu jelitowego chorych. Metody statystyczne zastosowano prawidłowo. Dyskusja jest przeprowadzona wyśmienicie. Autorka krytycznie odnosi się do wyników badań własnych i potrafi skonfrontować swoje znaleziska z prezentowanymi w innych opracowaniach naukowych. Doskonale tłumaczy czytelnikowi implikacje fenotypowe obserwowanych zmian zarówno taksonomicznych jak i metabolomicznych. Wskazuje także limitacje badań, czym podkreśla rzetelność warsztatu badawczego. Wnioski są trafne i wynikają z wyników badań.

Układ wszystkich prac, wraz z zakresem dobranej literatury pozwalają potwierdzić, że Doktorantka jest dobrze przygotowana do prezentowanej tematyki badawczej, a jej warsztat metodologiczny nie budzi zastrzeżeń. Publikacje składające się na cykl, są bardzo dobrze i starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną do prezentowania określonego typu wyników dokumentację graficzną, w tym uzyskaną w programach bioinformatycznych do obróbki wyników sekwencjonwania genu 16S r RNA. Zastosowane w pracach przeglądowych schematy, w ocenie recenzenta, są jednak mało czytelne.

Podobnie wysoką jakością jak publikacje z tzw. cyklu, odznacza się rozdział dotyczący omówienia prac i jego streszczenie. Autorka w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawiła całość zagadnienia, naświetliła cele i przebieg badań oraz podkreśliła ważność uzyskanych wyników, wskazując na wkład w badania podstawowe i translacyjne. Wnioski są trafne i czytelne. Część z przedstawionych wniosków należy uznać jako wprowadzenie do kolejnych badań naukowych z omawianego tematu. W tej części opracowania, Doktorantka zacytowała 40 publikacji, aktualnych i właściwie dobranych, choć niestety nie powołała się na żadne z prac autorstwa zespołów polskich. Całość napisana jest poprawnym stylistycznie językiem polskim.

Na szczególne podkreślenie w rozprawie doktorskiej zasługują:

- koherencja przedstawionych treści,
- zmatchowanie populacji kontrolnej (z pracy badawczej) względem wieku i płci, a więc niemodyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju chorób serca,
- przedstawieenie wyników analiz metabolomicznych w podziale na wartość wskaźnika Firmicutes/Bacteriodetes
- zastosowanie metod analizy funkcjonalnej mikrobioty w oparciu o narzędzia bioinformatyczne oraz analizy metabolomiczne

Wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają znaczący wkład w tworzenie polskiej nauki zogniskowanej na mikrobiocie jelitowej i udziału tzw. narządu bakteryjnego w kształtowaniu zdrowia układu krążenia. Są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż uzupełniają wiedzę na temat praktycznego wykorzystania możliwości modyfikacji mikrobiomu jelitowego w profilaktyce chorób serca i wsparcia terapeutycznego tych schorzeń.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej nasunęły mi się się też pewne uwagi i pytania:

1. Zdecydowanie Autorka nie powinna używać w rozprawie doktorskiej pojęcia „mikroflora" w stosunku do drobnoustrojów jelitowych, a zastąpić je słowami mikroorganizmy, mikrobiota lub mikrobiom;
2. W kolejnych pracach sugeruję posługiwać się nowym nazewnictwem taksonomicznym ustalonym w 2021 roku przez ICNP (International Code of Nomenclature for Prokaryotes);

3. Typy bakteryjne nie powinny być zapisywane kursywą;
4. Analizy taksonomiczne mogą zostać wykonane techniką amplifikacji różnych regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA, a nie wyłącznie jak wskazała Autorka V3–V4;
5. Dlaczego nie uwzględniono BMI przy doborze osób z grupy kontrolnej?
6. Kompozycja mikrobioty ulega silnym i nieustannym fluktuacjom, przy czym wiek, płeć, czynniki genetyczne gospodarza, warunki środowiskowe i szeroko rozumiany styl życia – przede wszystkim dieta - odgrywają tutaj rolę priorytetową. Zatem, czy możemy pozwolić sobie na definicję „prawidłowej mikrobioty" lub „mikrobioty zdrowego człowieka"? Czy znane są wskaźniki referencyjne dla ekosystemu jelitowego zdrowego człowieka ? Wydaje się, że na chwilę obecną nie można tego określić, a tzw. zdrowa mikrobiota to jedynie fenomen teoretyczny. Choć naukowcy wytrwale dążą do ich odkrycia to jedynie wysoka różnorodność mikrobioty może być uznana za swoisty gwarant zdrowia. Jednak nawet tutaj trudno o obiektywizm gdyż przykładowo czas pasażu jelitowego wpływa na bogactwo drobnoustrojów w dużym stopniu. Doprowadza nas to do punktu zwrotnego w rozważaniach nad mikrobiotą. O ile każdy z nas może mieć różny skład bakterii jelitowych, to aktywność mikroorganizmów jest niemal identyczna. Parametrem na który zatem należy zwrócić uwagę przy określaniu „poprawności" mikrobioty jelitowej, jest jej aktywność określana między innymi syntezą metabolitów istotnych dla procesów fizjologicznych w organizmie człowieka. Nie umniejszając jednak zasadności badań taksomonicznych w wykorzystaniem nowoczesnych metod sekwencjonowania genomu bakteryjnego, prezentowane w pracy syntetyczne opracowanie dotyczące zmian kompozycji mikrobioty stwierdzane w przypadku chorób układu sercowo-naczyniowego jest doskonałe. Choć w praktyce klinicznej samo w sobie nie ma ono większego znaczenia, tak w naukowym ujęciu jest istotne gdyż dzięki tym informacjom byliśmy w stanie poznać tajniki rządzące metabolomem mikrobioty. A ten już klinicznie wydaje się być kluczowy.

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy. Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną , ale co najważniejsze z dążeniem do prezentacji wyników o charakterze aplikacyjnym. Umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia oraz wnikliwa i twórcza dyskusja w prezentowanych pracach są doskonałe.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska lek. **Emilii Sawickiej – Śmiarowskiej pt. „ Rola mikrobiomu w powstawaniu i progresji choroby niedokrwiennej serca"** stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz **spełnia wymogi** art. 13 ust. Ustawy *z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z poźn.zm.) oraz z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 z poźn.zm.).* W związku z powyższym, przedstawiam Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku **wniosek o dopuszczenie Pani Emilii Sawickiej – Śmiarowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę ponadprzeciętnie wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz pozostały dorobek naukowy Autorki wnioskuję do Wysokiej Rady **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni Badań Biochemicznych
dr hab. n. med. i zdr. Karolina Skonieczna-Żydecka

.....

Dr hab. n. med. i zdr. Karolina Skonieczna-Żydecka