

Opinia

dotycząca rozprawy doktorskiej mgr Marty Marii Grochowskiej pt.: „Badanie mikrobioty jelita u ludzi oraz u szczurów przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji (*next generation sequencing*) wspartych analizą metagenomiczną „,

Znaczenie mikrobiota w zdrowiu i chorobie jest dzisiaj obiektem licznych badań naukowych głównie z uwagi na potwierdzone funkcjonowanie w symbiozie z organizmem człowieka i udziału w homeostazie oraz regulacji czynności układu immunologicznego. Natomiast dysbioza w układzie mikrobiota może prowadzić do zaburzeń funkcjonowania poszczególnych układów lub narządów.

Przypomnę, że termin *mikrobota* pochodzi z początków 1900 roku i odzwierciedla potwierdzoną obecność różnych mikroorganizmów, tj. bakterii, wirusów, grzybów i innych drobnoustrojów w poszczególnych częściach ciała. Ostatnie lata, to wprowadzenie terminu „ukryty narząd„, który odzwierciedla potwierdzone wyniki badań, że populacja harmonijnych mikroorganizmów zasiedlających ciało człowieka tworzy ponad 150-krotnie większą pulę genetyczną niż ludzki genom i ma niewątpliwie ważny udział w fizjologii człowieka. Stąd też kolejny termin wprowadzony do badań - *mikrobiom*. Wielu badaczy używa obydwu terminów zamiennie.

Mikrobiom różni się swoim składem w poszczególnych częściach ciała; ten zawarty w przewodzie pokarmowym wydaje się odgrywać niezwykle ważną rolę w utrzymaniu zdrowia każdego człowieka. Bakterie wchodzące w skład mikrobiomu człowieka biorą udział w procesach fermentacji produktów pokarmowych, ochronie przed innymi patogenami, pobudzaniu układu immunologicznego i syntezie witamin. Oprócz bakterii, w tej przestrzeni, potwierdzono także obecność grzybów, wirusów, fagów i innych mikroorganizmów.

W zdrowiu, mikrobiota przewodu pokarmowego stanowią stabilny, odporny układ pozostający w symbiozie z organizmem gospodarza. Kompozycja bakterii wchodzących w skład mikrobiomu zdrowego człowieka jest zależna od odcinka przewodu pokarmowego a także od wieku i stosowanej diety. W licznych schorzeniach także tych, które dotyczą innych narządów niż przewód pokarmowy wykazano zmiany w składzie mikrobiomu jelit. Ważną i potwierdzoną obserwacją jest fakt wykazania zależności pomiędzy sprawnością przewodu pokarmowego a pracą mózgu.

Przełomem w tym sektorze analitycznym jest rozwój technik obrazowych mózgu datowany na początek lat 80-tych XX wieku; jest to także początek badań nad rolą i ewentualnym udziałem osi jelitowo – mózgowej w zdrowiu i w patogenezie takich jednostkach chorobowych jak zespół jelita drażliwego a w następnych latach w wybranych chorobach neurodegeneracyjnych.

Doktorantka podjęła niesłychanie ważny i trudny badawczo problem naukowy jaki jest ocena mikrobioty u ludzi oraz u zwierząt doświadczalnych w różnych chorobach ośrodkowego układu nerwowego wykorzystując nowoczesną technikę sekwencjonowania następnej generacji wspartą analizą metagenomiczną.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl 5 publikacji podzielonych na prace przeglądowe (trzy artykuły) i dwie – oryginalne prace twórcze. Sumaryczna punktacja tych prac to skala: Impact Factor 15,38 i MEiN – 470. Pierwszym autorem jest w czterech publikacjach.

Przedstawione prace przeglądowe:

1. Grochowska Marta, Wojnar Marcin, Radkowski Marek: The gut microbiota in neuropsychiatric disorders. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 2028, 78(2), 69 – 81
2. Grochowska Marta, Laskus Tomasz, Radkowski Marek: Gut microbiota in neurological disorders. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2019, 67(6), 375-383
3. Grochowska Marta, Perlejewski Karkol, Laskus Tomasz, Radkowski Marek: The role of gut microbiota in gastrointestinal cancers. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 022, 3;70(1):7

Oryginalne prace twórcze:

4. Perlejewski Karol, Pawełczyk Agnieszka, Bukowska – Ośko Iwona, Rydzanicz Magorzata, Dzieciatkowski Tomasz, Paciorek Marcin, Makowiecki Michał, Caraballo Cortes Kamila, Grochowska Marta, Radkowski Marek, Laskus Tomasz: Search for viral infections in cerebrospinal fluid from patients with autoimmune encephalitis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020, 7 (11), 1 -16
5. Grochowska Marta, Laskus Tomasz, Paciorek Marcin, Pollak Agnieszka, Lechowicz Urszula, Makowiecki Michał, Horban Andrzej, Radkowski Marek, Perlejewski Karol Patients with infection o the central nervous system have lowered gut microbiota alpha diversity. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2022, 44(7), 2903-2914.

Kandydatka jest także współautorką innych prac naukowych w liczbie trzech o łącznym IF – 11,37; punktacja MNiE – 195 oraz pięciu wystąpień zjazdowych.

W publikacji nr 1 przedstawia najnowsze wyniki badań naukowych potwierdzających wpływ diety a w konsekwencji składu mikrobioty jelitowej na zachowanie dzieci z rozpoznaniem spektrum autyzmu (ASD). U dzieci z autyzmem zdiagnozowano różnice w składzie mikrobioty jelitowej, tj. większą ilość *Clostridium spp.* zmieniony stosunek *Firmicutes/Bacteroides* i inne odmienności bakteriologiczne. Podobne wyniki potwierdzono w badaniach eksperymentalnych dotyczących depresji i lęku.

W publikacji nr 2 analizowała aktualną wiedzę na temat znaczenia mikrobioty jelitowej u chorych z stwardnieniem rozsianym, chorobą Alzheimera i w chorobie Parkinsona. W każdej z wymienionych chorób neurodegeneracyjnych stwierdzono zmiany ilościowe oraz zmiany składu flory bakteryjnej jelit w porównaniu z wynikami uzyskanymi od ludzi zdrowych.

Publikacja nr 3, to zebrana wiedza na temat składu mikrobioty jelitowej u chorych z nowotworami przewodu pokarmowego, tj. z rakiem wątrobowo-komórkowy oraz z rakiem jelita grubego. Obserwowane zmiany w składzie bakterii przewodu pokarmowego jak i zmieniająca się ilość

różnych drobnoustrojów mogą mieć znaczenie w rozwoju, klinice oraz skuteczności terapii wybranych chorób nowotworowych.

Te trzy publikacje przeglądowe stanowią doskonale wprowadzenie i uzasadnienie do konieczności rozwijania dalszych badań nad zmiennością ilościową i jakościową flory bakteryjnej przewodu pokarmowego w różnych schorzeniach, w tym w przewlekłych degeneracyjnych chorobach układu nerwowego i nowotworach przewodu pokarmowego. Pośredni lub bezpośredni udział mikrobioty jelitowej w rozwoju chorób lub powikłań dotyczących innych układów niż przewód pokarmowy był podejrzewany od ponad 100 lat i dopiero w ostatnich 30 latach zaczęto rozwijać badania naukowe na ten temat. Można zatem pogratulować Doktorantce wyboru problemu badawczego.

Kolejna publikacja (nr 4) to studium badawcze, w którym zastosowanie techniki polimerazowej reakcji łańcuchowej w czasie rzeczywistym (RT-PCR/PCR) z szybką analizą metagenomową stwierdzonego w badanej próbce materiału genetycznego umożliwiło rozpoznanie zakażeń wirusowych u trzech spośród 8 chorych z autoimmunologicznym zapaleniem mózgu. Ten wynik popiera koncepcję o udziale wirusów, zróżnicowanych taksonomicznie, w patogenezie tej jednostki chorobowej. Sformułowanie ostatecznych wniosków wymaga jednak dalszych i wysoce skomplikowanych badań.

Ostatnia (nr 5) publikacja, to analiza mikrobiota w pojedynczej próbce kału u chorych z neuroinfekcjami. Mgr Grochowska udowodniła zmniejszenie obciążenia przewodu pokarmowego niektórymi drobnoustrojami w porównaniu z kontrolą, ich niższą różnorodność gatunkową oraz brak istotnego wpływu krótkoczasowej terapii antybiotykiem na skład mikrobiomu przewodu.

Obydwie prace naukowe bilansujące badania własne Doktorantki dokumentują ewentualny udział drobnoustrojów jelitowych w rozwoju różnych jednostek chorobowych. Wydaje się jednak, że to dopiero początek długiej i niesłychanie interesującej drogi naukowej mgr Grochowskiej; w przyszłości, być może odpowiedni dobór produktów żywnościowych pozwoli na uzyskanie lepszych efektów terapeutycznych w wybranych jednostkach chorobowych.

Nie mam żadnych istotnych uwag merytorycznych dotyczących omówienia dołączonych publikacji jako podstawy rozprawy doktorskiej poza zachętą do zgłębiania tajników tej dziedziny medycyny. Proszę jednak Kandydatkę o komentarz dotyczący, bardzo wartościowych badań płynu mózgowo-rdzeniowego, pochodzącego od chorych z autoimmunologicznym zapaleniem mózgu. Poprzez ten zapis pragnę zwrócić uwagę na fakt, że współczesne techniki biologii molekularnej pozwalają na rozpoznanie czynnika sprawczego obecnego w materiale biologicznym w minimalnej ilości. Mgr Grochowska znakomicie posługuje się tymi technikami badawczymi.

Podsumowując, Doktorantka pokazała samodzielność w planowaniu badań naukowych, ostrożnie interpretując i analizując uzyskane wyniki; co niezwykle ważne - posługując się wspaniałą wiedzą w uprawianej przez siebie dziedzinie nauki. W publikacjach przedstawiła cenne, także w praktyce klinicznej, wyniki badań, przy których wykorzystała najnowsze metody biologii molekularnej.

Jako klinicysta mogę jedynie potwierdzić relację pomiędzy przewodem pokarmowym a ośrodkowym układem nerwowym. Klasycznym i dawno obserwowanym przykładem jest tutaj encefalopatii wątrobowa. Dlatego też każdy projekt naukowy, w którym zawarto badania nad mikrobiomem jelitowym i jego udziałem w rozwoju chorób zwłaszcza ośrodkowego układu nerwowego zasługuje na uwagę i w miarę możliwości – realizację.

Gratuluję wyboru tematu w podjętych badaniach.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.).

Wniosek końcowy.

Przedstawiona powyżej opinia upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie wniosku o dopuszczenie mgr Marty Grochowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków 15.07.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Anna Boroń - Kaczmarska