

Rabka-Zdrój 25.07.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Lek. Kamila Bara

pt.: Odrębności bakteryjnej mikrobioty dróg oddechowych dzieci chorujących na astmę oskrzelową

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani lek. Kamila Bara: „*Odrębności bakteryjnej mikrobioty dróg oddechowych dzieci chorujących na astmę oskrzelową*” została wykonana w I Katedrze i Klinice Pediatrii, Alergologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab.n.med. Barbary Sozańskiej, profesora Uczelni.

Astma jest najczęstszą przewlekłą chorobą układu oddechowego u dzieci. Przebieg kliniczny uwarunkowanej czynnikami genetycznymi choroby jest zależny w istotny sposób od ekspozycji na zróżnicowane czynniki środowiskowe. Od wielu lat podkreśla się rolę szeroko pojętego mikrobiomu, jednak jak dotąd nie określono jednoznacznie wpływu mikroorganizmów na rozwój i fenotyp kliniczny astmy. Możliwości badań w tym zakresie stworzyły nowe metody izolacji materiału genetycznego i badania genów markerowych flory bakteryjnej dróg oddechowych oraz rozwój nieinwazyjnej metody badania układu oddechowego. Wydaje się, że stało się to również zachętą dla podjęcia badań mikrobioty dróg oddechowych przez lek. Kamila Bara.

Praca doktorska została lek. Kamila Bara została przygotowana w oparciu o cykl publikacji i zawiera następujące rozdziały : wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody, publikacje cyklu doktorskiego, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo oraz załączniki. Całość poprzedzona jest wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W krótkim wstępie autor przedstawia założenia swojej pracy których szczegółowe rozwinięcie znalazło się w opublikowanych pracach. Wskazuje on na rolę i możliwości badań genetycznych mikrobiomu z wykorzystaniem charakterystycznego genu markerowego 16S rRNA, pozwalającego na przypisanie mikroorganizmów do określonego, wspólnego klastera.

Ponadto autor uzasadnia możliwości użycia badania kondensatu wydychanego powietrza celem oceny bakteryjnego mikrobiomu u dzieci. W rozdziale „Cele i założenia pracy” autor określiła cele badawcze pracy oryginalnej Bar K, Żebrowska P, Łaczmański Ł, Sozańska B. Airway Bacterial Biodiversity in Exhaled Breath Condensates of Asthmatic Children—Does It Differ from the Healthy Ones? *J. Clin. Med.* 2022, 11, 6774. <https://doi.org/10.3390/jcm11226774>, (IF = 4,964), Pkt. MNiSW: 140.00, a także pracy pogładowej: Bar, K.; Litera-Bar, M.; Sozańska, B. Bacterial Microbiota of Asthmatic Children and Preschool Wheezers’ Airways—What Do We Know? *Microorganisms* 2023, 11, 1154. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051154> IF : 4,926 MNiSW : 40 pkt.

Kolejny rozdział zawiera opis metodologii badania w którym uczestniczyło 38 dzieci w wieku 6-17 lat. Do grupy badanej włączono 19 dzieci z rozpoznaną astmą atopową lub nieatopową, będących pacjentami Przyklinicznej Poradni Alergologicznej przy I Katedrze i Klinice Pediatrii, Alergologii i Kardiologii UM we Wrocławiu oraz 19 dzieci nie chorujących na astmę stanowiło które stanowiły grupę kontrolną.

U wszystkich zakwalifikowanych dzieci przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe, dodatkowo rodzic pacjenta/przedstawiciel ustawowy był proszony o wypełnienie autorskiej ankiety o ogólnym stanie zdrowia, warunkach socjalnych i rodzinnym narażeniu na choroby alergiczne. W badanej grupie zgodnie z ustaloną metodologią pobierano wymaz z jamy ustno-gardłowej a następnie celem pobrania materiału z dolnych dróg oddechowych wykonywano badanie kondensatu powietrza wydychanego z użyciem jednorazowych zestawów RTube (Respiratory Research, Inc., USA). Celem oceny mikrobioty bakteryjnej oznaczano regiony V3-V4 16s rRNA w badanych próbkach. Całość analizy laboratoryjnej przeprowadzono w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. W przypadkach obu typów badań przeprowadzono następujące etapy : ekstrakcję bakteryjnego DNA, przygotowanie bibliotek DNA do sekwencjonowania, amplifikację materiału genetycznego metodą PCR, sekwencjonowanie uzyskanego materiału. Do analizy uzyskanych wyników użyto odpowiednio dobranych metod statystycznych.

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu nr KB – 175/19 z dnia 08.01.2019.

Kolejny rozdział zawiera publikacje cyklu doktorskiego – opis założeń i wyników pracy oryginalnej i pracy pogładowej wraz z reprintami publikacji. W pracy oryginalnej Bar K, Żebrowska P, Łaczmański Ł, Sozańska B. Airway Bacterial Biodiversity in Exhaled Breath Condensates of Asthmatic Children—Does It Differ from the Healthy Ones? *J. Clin. Med.* 2022, 11, 6774. <https://doi.org/10.3390/jcm11226774>, (IF = 4,964), Pkt. MNiSW: 140.00, wykazano że wymazy z

jamy ustno-gardłowej charakteryzują się większą alfa-różnorodnością w stosunku do kondensatów powietrza wydychanego. Stwierdzono również, że mikrobiota bakteryjna dolnych dróg oddechowych astmatyków cechuje się większą alfa-różnorodnością w porównaniu do zdrowych rówieśników. Do czynników wpływających na różnice w materiale dolnych dróg oddechowych astmatyków w kontekście beta-różnorodności należały narażenie na bierne palenie, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób alergicznych, codzienne przyjmowanie leków przeciwastmatycznych oraz miejsce zamieszkania (miasto/wieś). Autor stwierdza, iż w obu częściach układu oddechowego dominującymi typami bakterii były Firmicutes, Proteobacteria i Actinobacteriota. W obrębie klas stężenie Gammaproteobacteria i Bacilli było większe w materiale z kondensatów w grupie dzieci zdrowych.

Drugi z artykułów : Bar, K.; Litera-Bar, M.; Sozańska, B. Bacterial Microbiota of Asthmatic Children and Preschool Wheezers' Airways—What Do We Know? *Microorganisms* 2023, 11, 1154. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051154>, IF : 4,926 MNiSW : 40 pkt, stanowi analizę prac oryginalnych dotyczących mikrobiomu bakteryjnego dróg oddechowych u dzieci chorujących na astmę, przy czym warunkiem włączenia pracy do przeglądu było użycie do oznaczenia bakteryjnego 16S rRNA do celów taksonomicznych oraz oceny biostatystycznej. Krytyczna analiza kryteriów rozpoznania astmy, materiału użytego do identyfikacji bakterii pozwoliła na postawienie wniosków, szczegółowo opisanych w pracy.

W kolejnym rozdziale autor poddaje dyskusji wyniki własnej pracy oryginalnej wskazując, iż uzyskane wyniki biostatystyczne i oznaczenia taksonomiczne wydają się zgodne z dotychczasowymi wynikami innych badaczy, przy czym zwraca jednak uwagę na zróżnicowanie wyników badań czynników środowiskowych. Z kolei w pracy poglądowej wskazuje na podobieństwa mikrobiomu u zdrowych i chorych na astmę pod względem udziału głównych typów bakterii a obserwowane różnice mają w większości charakter ilościowy.

Wnioski z publikacji które obejmuje praca doktorska, odpowiadają na szczegółowe pytania badawcze postawione w celach obydwu prac i stanowią powtórzenie wniosków zamieszczonych w pracach które zostały opublikowane. Na podstawie przeprowadzonych badań autor stwierdza, iż mikrobiota bakteryjna górnych dróg oddechowych u astmatyków w populacji dziecięcej nie różni się istotnie w porównaniu z dziećmi zdrowymi, nie obserwuje się również różnic między spektrum bakterii w różnych częściach układu oddechowego. Najliczniej prezentowanymi typami bakterii w materiale z górnych i dolnych dróg oddechowych były Proteobacteria, Firmicutes i Bacteroidetes. Mikrobiota dolnych dróg oddechowych dzieci chorych na astmę charakteryzuje się większą alfa-różnorodnością oraz beta-różnorodnością w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Obserwowane są również różnice w zależności od sposobu rozwiązania ciąży. Większa alfa-różnorodność w badaniach kondensatów powietrza występuje u chorych z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku chorób alergicznych. U dzieci chorych istotnie niższa była liczebność

klas Gammaproteobacteria i Bacilli, a różnice w zakresie beta-bioróżnorodności związane były z ekspozycją na dym tytoniowy, chorobami alergicznymi w rodzinie, przyjmowaniem leków przeciwastmatycznych oraz miejsce zamieszkania (miasto/wieś). Autor podsumowując stwierdza, iż uzyskane wyniki wskazują, iż nieinwazyjne badania mikrobiomu dolnych dróg oddechowych z użyciem kondensatu powietrza wydychanego mogą być ważnym narzędziem badawczym i diagnostycznym.

Piśmiennictwo zawarte w pracy zostało dobrane i zacytowane poprawnie i objęło 40 pozycji, wybranych spośród 105 pozycji piśmiennictwa które znalazły się w obydwu pracach wchodzących w skład pracy doktorskiej. Praca liczy 77 stron, zawiera ogółem 11 rozdziałów i została opublikowana w starannej szacie graficznej.

Podsumowanie:

Podjęcie się przez lek. Kamila Bara badań będących podstawą przedstawianej rozprawy doktorskiej uważam za nowatorskie i ważne zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia. Uzyskane przez niego wyniki mają wysoką wartość poznawczą a przedstawione prace, zarówno oryginalna jak i pogładowa zostały opublikowane w czasopismach o wysokiej punktacji IF, co podkreśla wartość uzyskanych wyników. Należy przy tym zaznaczyć, że według wiedzy autora było to pierwsze u dzieci chorych na astmę badanie mikrobioty bakteryjnej dolnych dróg oddechowych przy użyciu kondensatów powietrza wydychanego. Praca realizowana była w zespole wielodyscyplinarnym, w badaniu materiału genetycznego zastosowano również własną modyfikację dotychczas stosowanej metody.

Wszystkie te elementy pozwalają bardzo wysoko ocenić pracę lek. Kamila Bara i uznać ją za wnoszącą istotny wkład w nowoczesną wiedzę medyczną.

Z obowiązku recenzenta mogę jedynie zwrócić uwagę na nieliczne błędy literowe w starannie przygotowanym tekście pracy. Nie jest też dla mnie oczywiste miejsce gdzie wykonywano badania kondensatu powietrza wydychanego (poradnia alergologiczna, oddział kliniczny, pracownia badań czynnościowych ?). Te uwagi jednak w najmniejszym stopniu nie zmieniają niezwykle wysokiej oceny przedstawionej pracy.

Dlatego też, uwzględniając wszystkie powyżej przedstawione elementy oceny rozprawy na stopień doktora nauk lek. Kamila Bara pt.: „*Odrębności bakteryjnej mikrobioty dróg oddechowych dzieci chorujących na astmę oskrzelową*” mogę stwierdzić, iż przedstawiona 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 powyższym mam zaszczyt wnieść do

Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Kamila Bara do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorski charakter projektu badawczego, zastosowane metody badawcze oraz wysoką ocenę merytoryczną pracy potwierdzoną publikacjami w renomowanych czasopismach, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych o wyróżnienie przedstawionej pracy.


KIEROWNIK KLINIKI
Pneumonologii
dr hab.n.med.Zbigniew Doniec,prof. Instytutu