



III KATEDRA PEDIATRII

KLINIKA PNEUMONOLOGII, ALERGOLOGII DZIECIĘCEJ I IMMUNOLOGII KLINICZNEJ

PROF. DR HAB. MED. ANNA BRĘBOROWICZ

ul. Szpitalna 27/33
60-572 Poznań

tel. 061 849 13 43

fax. 061 849 12 43

e-mail: klinikapad@skp.ump.edu.plemail: ambreborowicz@ump.edu.plUniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RADY DYSCYPLINY
NAUKI MEDYCZNE

wpł. 21-07-2023

Lp. RN-BM 1317

Poznań, dnia 18.07.2023

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie medycyna
lek. med. Kamila Bara**

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

Mam zaszczyt i przyjemność wystąpić w roli recenzenta drugiej w krótkim czasie rozprawy doktorskiej, która powstała w I Katedrze i Klinice Pediatrii, Alergologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu kierowanej przez prof. dr hab. Barbarę Sozańską. Obie rozprawy dowodzą wysokiego poziomu naukowego jednostki i koncentracji na bardzo aktualnych, ciekawych, ale i trudnych zagadnieniach związanych z astmą dziecięcą.

Wielokierunkowe badania nad patogenezą astmy są źródłem nowych koncepcji rozwoju choroby, odkrywają nowe szlaki indukcji zapalenia, ujawniają zróżnicowany udział różnych mechanizmów. Uzasadnia to postrzeganie astmy jako zespołu chorobowego, zdefiniowanie różnych jej endotypów i fenotypów i wreszcie na poziomie klinicznym personalizację leczenia. Poznanie etiopatogenezy choroby powinno zgodnie z oczekiwaniami przyczynić się do ustalenia możliwości profilaktyki, precyzyjnego i pewnego rozpoznawania, monitorowania aktywności choroby i znalezienia skutecznych metod terapii. Faktycznie wprowadzone na przestrzeni ostatnich kilku dekad leki przeciwzapalne, bronchodilatacyjne i leki biologiczne blokujące wybrane ogniwa patogenetyczne w sposób dramatyczny wpłynęły na przebieg choroby i jakość życia pacjentów. Nadal jednak nie znaleziono skutecznych metod profilaktyki, nie zmienia się epidemiologia ani astmy, ani innych chorób alergicznych. Nadal nie u wszystkich możliwa jest kontrola choroby i wreszcie możliwość wyleczenia astmy jest

ciągle nieosiągalna. Sytuację komplikuje fakt, że czynniki z tej samej grupy mogą wywierać dwojakie zupełnie różne działania w zależności od intensywności, okoliczności, czasu ekspozycji np. ekspozycja na alergen może indukować uczulenie, ale też tolerancję alergenu. Szczególnie złożona sytuacja dotyczy udziału czynników infekcyjnych w patogenezie astmy. Do początku lat 80. tych ubiegłego wieku czyli do czasu narodzin hipotezy higienicznej dostrzegano wyłącznie ich negatywne działanie pod postacią indukcji rozwoju i zaostrzeń astmy. Hipoteza higieniczna, która przez lata ewaluowała w kierunku hipotezy bioróżnorodności sugeruje dobroczynny wpływ stymulacji mikrobiologicznej i mikrobioty dla utrzymania równowagi immunologicznej chroniącej przed rozwojem reakcji nadwrażliwości. Nadal zaostrzenia astmy wiąże się z ekspozycją na czynniki infekcyjne, ale udział różnych wirusów i profil bakteryjnej kolonizacji górnych i dolnych dróg oddechowych w odniesieniu do objawów są przedmiotem szeroko prowadzonych badań. Postęp w zakresie metod pozyskiwania materiału, nowe techniki badawcze i nowoczesne metody analizy wzbogacają, ale też zmieniają dotychczasową wiedzę co może okazać się istotne dla terapii. W ten bardzo aktualny nurt badań nad mikrobiotą dróg oddechowych u dzieci chorych na astmę wpisują się nowatorskie oryginalne badania dr Kamila Bara. Podjęcie tych badań uważam za w pełni celowe i przydatne, mają one znaczenie z naukowego, poznawczego punktu widzenia i mogą mieć wpływ na praktykę kliniczną.

Rozprawa została przygotowana w formie książkowej zawierającej rozdziały, analogiczne do zwyczajowych rozdziałów rozpraw w formie monografii takie jak streszczenia w języku polski i angielskim, wstęp, cele i założenia pracy, materiał i metody. Kolejny zasadniczy rozdział stanowią kopie publikacji cyklu doktorskiego. Ostatnie rozdziały obejmują dyskusję, wnioski oraz bibliografię). Uzupełnieniem są załączniki zawierające zestawienie dorobku naukowego Doktoranta, oświadczenia o współautorstwie, Zgodę komisji bioetycznej oraz Ankietę dla Rodziców.

We wstępie (2 stronicowym) Doktorant sygnalizuje uwarunkowania astmy zwracając szczególną uwagę na rolę czynników infekcyjnych i stymulacji mikrobiologicznej. Definiuje mikrobiom i mikrobiotę, krótko charakteryzuje nowoczesne metody badania obecności drobnoustrojów i dostępność materiału do badań.

Cele zarówno badań oryginalnych jak i pracy poglądowej sformułowane są jasno i szczegółowo określają obszar zainteresowań Doktoranta. Materiał i metodyka opisane są w sposób skrócony, co jest uzasadnione faktem, że pełen opis znajduje się w publikacji. Całość analizy laboratoryjnej przeprowadzono w profesjonalnym wysokospecjalistycznym Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona przy pomocy odpowiednio dobranych metod. W kolejnej części opracowania Doktorant



krótko przedstawia wyniki pracy oryginalnej i kryteria włączenia prac do przeglądu piśmiennictwa omówionego w pracy poglądowej.

Zasadnicza część przedstawionej do recenzji rozprawy obejmuje 2 artykuły powiązane tematycznie. W obu publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. Pierwsza praca pt. *Airway bacterial biodiversity in exhaled breath condensates of asthmatic children - does it differ from the healthy ones?* (Bar K., Żebrowska P., Łaczmański Ł., Sozańska B.) jest prezentacją własnych oryginalnych wyników i została opublikowana w roku 2022, druga pt. *Bacterial microbiota of asthmatic children and preschool wheezers' airways – what do we know?* (Bar K., Litera-Bar M., Sozańska B.) ma charakter pracy poglądowej i opublikowano ją w bieżącym roku. Obie zostały opublikowane na łamach recenzowanych czasopism. Tym samym obie prace musiały przed dopuszczeniem do druku uzyskać pozytywne opinie międzynarodowych, z pewnością wymagających recenzentów i opinie te podzielałam w mojej recenzji. Łączna punktacja IF za obie prace wynosi – 9.89, a w punktacji MNiSW – 180 punktów. Współautorzy publikacji w indywidualnych oświadczeniach określili swój udział w ich powstaniu. Doktorant jest także współautorem dwóch innych publikacji o łącznym IF 8,579 (wg punktacji MNiSW – 210 punktów) i dwóch innych prac bez punktacji IF. W sumie więc łączny IF Doktoranta wynosi 18,469, a punktacja MNiSW – 406.

Badania oryginalne, będące przedmiotem pierwszego artykułu, przeprowadzono w grupie 19 dzieci chorych na astmę i w liczącej 12 dzieci grupie kontrolnej w wieku 6 do 17 lat. Celem pracy było porównanie mikrobioty dróg oddechowych w obu grupach oraz porównanie mikrobioty górnych i dolnych dróg oddechowych. Dodatkowo analizowano wpływ takich czynników jak sposób rozwiązania ciąży, ekspozycja na palenie, a u chorych na astmę rodzinne obciążenie chorobami alergicznymi, stosowane leki, udział atopii, miejsce zamieszkania. Materiał do badań mikrobioty górnych dróg oddechowych stanowił wymaz z jamy nosowo-gardłowej, a mikrobiotę dolnych dróg oddechowych badano w kondensacie powietrza wydychanego z dróg oddechowych. Ta ostatnia metoda została po raz pierwszy wykorzystana w badaniu dzieci, wcześniej opublikowano jej zastosowanie na modelu zwierzęcym i w ocenie mikrobiomu i mykobiomu u dorosłych. Doktorant dla realizacji celu badawczego musiał pokonać trudności techniczne związane nie tylko z pozyskaniem materiału z dolnych dróg oddechowych (kondensat powietrza wydychanego), ale także z przygotowaniem bibliotek DNA do sekwencjonowania z materiału pochodzącego z kondensatu powietrza wydychanego. W ocenie mikrobiomu i różnorodności bakteryjnej górnych i dolnych dróg oddechowych zastosowano czułą i nowoczesną metodę opartą na identyfikacji drobnoustrojów na podstawie amplifikacji uzyskanego materiału genetycznego i sekwencjonowaniu bakteryjnego 16S rRNA dla celów taksonomicznych. Praca ma układ typowy, wstęp uzasadnia podjęcie badań, metodyka opisana jest bardzo szczegółowo. Porównano wyniki badań u chorych z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej. Zarówno

wybór nowoczesnych metod badania, ich konsekwentna realizacja jak i skuteczność diagnostyczna zasługują na uznanie. W analizie danych uwzględniono taksonomię oraz alfa i beta różnorodność. Wyniki omówiono systematycznie, obrazując je czytelnymi przejrzystymi rycinami. W ich analizie wykorzystano odpowiednie metody statystyczne i wskaźniki właściwe do oszacowania różnorodności alfa i beta, oceny jakościowej i ilościowej mikrobioty w tym metody służące przypisaniu taksonomii do wariantów sekwencji aminokwasów.

Mikrobiota górnych i dolnych dróg oddechowych wykazywały podobne zróżnicowanie, ale mikrobiota górnych dróg oddechowych była bogatsza pod względem liczby odmiennych typów bakterii i różnorodności filogenetycznej. Wyniki badań w materiale pobranym z górnych dróg oddechowych nie różniły się pomiędzy grup chorych i grupą kontrolną. Natomiast różnice dotyczyły dolnych dróg oddechowych bowiem w kondensacie powietrza wydychanego u dzieci chorych na astmę większe było bogactwo gatunków, ale z bardziej równomierną dystrybucją i podobnie spostrzeżenia dotyczyły badania kondensatu u dzieci urodzonych naturalnie. Natomiast alfa-różnorodność dolnych dróg oddechowych była większa u dzieci u dzieci chorych na astmę z rodzinnym obciążeniem chorobami alergicznymi niż bez takich obciążeń. W obu lokalizacjach dominowały typy *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteriota*. W kondensacie mniej liczne były klasy *Gammaproteobacteria* i *Bacilli*. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, przy czym w tych wcześniejszych badaniach mikrobiotę dolnych dróg oddechowych oceniano na ogół w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych.

Badania mają charakter pionierski, co jest istotną wartością pracy. Niewątpliwie są zwiastunem nowych możliwości wglądu w patogenezę astmy i nowych możliwości diagnostycznych jednak uwzględniając problemy metodologiczne i dotychczas obserwowane (i opisane w pracy poglądowej) duże zróżnicowanie wyników badań innych materiałów diagnostycznych, wymagać będą potwierdzenia przed wykorzystaniem dla celów leczniczych i prewencji. Tak jak wszystkie dotychczas stosowane metody diagnostyczne ta także musi być poddana weryfikacji klinicznej z oceną związku pomiędzy jakościową i ilościową charakterystyką mikrobioty a objawami, fenotypem i przebiegiem astmy. Ograniczeniem jest na pewno mała liczebność grup, co w powiązaniu z napotkanymi u części badanych trudnościami z uzyskaniem materiału (19 kondensatów i 12 wymazów w grupie badanej, w grupie kontrolnej po 14) i potencjalnym wpływem czynników dodatkowych nakazuje ostrożność w wnioskowaniu. Doktorant ocenił szereg korelacji między mikrobiotą a takimi czynnikami jak wywiad rodzinny, atopia u dziecka, wiek, leczenie, rodzaj porodu, miejsce zamieszkania narażenie na dym tytoniowy, ale analizy te wymagają weryfikacji na większym materiale. W dyskusji zawartej w publikacji Doktorant odwołuje się do nielicznych dotąd badań mikrobioty zwłaszcza dolnych dróg oddechowych u dzieci i bardziej licznych u dorosłych. W badaniach tych wykonywanych u dzieci źródłem materiału były popłuczyny

oskrzelowo-pęcherzykowe, a grupę badaną stanowiła nieliczna grupa dzieci z astmą ciężką. Ciekawe w badaniach u dorosłych było odniesienie mikrobioty do charakteru lokalnej reakcji zapalnej i jej zróżnicowanie w zależności od dominacji neutrofilów lub eozynofili. Ocena związku mikrobioty ze stosowaniem wziewnych glikokortykosteroidów (wGKS) jest w literaturze niejednoznaczna i trudno rozstrzygnąć czy odmienna mikrobiota decyduje o odpowiedzi na leczenie, czy leczenie zmienia mikrobiotę. W prezentowanej pracy stosowanie wGKS miało wpływ na beta różnorodność. Dyskusja jest konfrontacją wyników badań własnych z wynikami badań mikrobioty uzyskanych przez innych autorów, przeprowadzonych podobnymi lub innymi metodami. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnienia, znajomością piśmiennictwa i umiejętnością interpretacji oraz krytycznej oceny własnych badań. Dyskusja dowodzi dużej dojrzałości naukowej Doktoranta. Doktorant opiera się na aktualnym, dobrze dobranym piśmiennictwie. Publikacja została przygotowana bardzo starannie.

Praca pogładowa jest obszernym omówieniem dotychczasowych badań na temat mikrobioty górnych i dolnych dróg oddechowych u dzieci chorych na astmę. Uwzględniając problemy z rozpoznawaniem astmy u dzieci najmłodszych do analizy włączono także badania przeprowadzone u dzieci z obturacją czyli świszczącym oddechem, ale omówiono je oddzielnie. Uwzględniono wyłącznie badania, w których oceny mikrobioty bakteryjnej dokonano z zastosowaniem metody identyfikacji bakterii na podstawie badania 16S RNA. W opisie badań uwzględniono kryteria włączenia (w tym kryteria rozpoznania astmy), rodzaj materiału, istotne dane kliniczne, w tym wiek, liczebność badanych grup i główne wyniki charakteryzujące mikrobiotę ilościowo i jakościowo, różnorodność na poziomie typów i gatunków drobnoustrojów. Generalnie mikrobiota górnych i dolnych dróg oddechowych jest pod względem różnorodności podobna, różnica dotyczy głównie ilości drobnoustrojów.

W ocenie mikrobioty górnych dróg oddechowych wykorzystywano różny materiał o zróżnicowanej wartości diagnostycznej w tym wymazy z jamy nosowo-gardłowej, wymazy z gardła, popłuczyny nosowe, wymazy szczoteczkowe, wydzielinę z nosa lub ślinę. W niektórych pracach materiał pobierano kilkakrotnie, korelowano wyniki z fenotypami klinicznymi astmy, ze stopniem aktywności choroby (remisja, okresy bezobjawowe i objawowe), ze stopniem kontroli objawów, wynikami badań czynnościowych. Zaostrzenia i brak kontroli korelowały na ogół z większą ilością wykrywanego materiału bakteryjnego, współistnieniem rinowirusów i obecnością *Moraxella catarrhalis*, a także zmniejszeniem *Corynebacterium 1* i *Dolosigranulum*. Nie odnotowano istotnych różnic jakościowych w profilu mikrobiologicznym chorych na astmę i dzieci zdrowych, natomiast wyniki oceny ilościowej były zróżnicowane. W badaniach związku pomiędzy mikrobiomem a atopią zwracają uwagę niejednolite kryteria wartości asIgE uznawanych za podwyższone, co utrudnia porównywanie badań. Podobny problem pojawia się przy interpretacji mikrobiomu u

dzieci z nawrotowym świszczącym oddechem. Badania w tej grupie dzieci prowadzone są pod kątem możliwości przewidywania u nich rozwoju astmy w oparciu o wczesny profil mikrobiomu i poszukiwania możliwości działań prewencyjnych.

Badania mikrobiomu dolnych dróg oddechowych są na pewno trudniejsze, stąd ich mniejsza liczba. Doktorant omówił je również systematycznie i szczegółowo. Wobec faktu, że w większości materiał pozyskiwany jest metodami inwazyjnymi wskazania do jego pobierania są ograniczone i najwięcej badań wykonano u dzieci z astmą ciężką. Stąd też wyniki nie mogą być uogólniane na całą populację chorych na astmę. W niektórych badaniach diagnostyka obejmowała także klasyczne metody wykrywania antygenów drobnoustrojów zwłaszcza wirusowych, izolację materiału genetycznego przy pomocy amplifikacji metodą PCR oraz hodowle bakteryjne. Wartość tych prac jest szczególna, bo przecież dotąd na tych badaniach zbudowano wiedzę na temat korelacji mikrobiologiczno-klinicznych. Doktorant wnikliwie i całościowo omówił wyniki cytowanych badań, nie tylko bezpośrednio charakteryzujące mikrobiotę, ale także wyniki oznaczeń cytokin i ekspresji genów związanych z zapaleniem. Badania te służą ustaleniu znaczenia określonych stymulacji w indukcji różnych szlaków zapalenia w astmie. Porównanie wyników z górnych i dolnych dróg oddechowych ujawniło większą różnorodność alfa i beta i większą obfitością bakterii na poziomie dolnych dróg oddechowych. Na tle omawianych prac wyróżnia się jedyna jak dotąd publikacja Doktoranta oparta na materiale uzyskanym z kondensatu powietrza wydychanego.

Omówiono także badania mikrobiomu dolnych dróg oddechowych u dzieci ze świszczącym oddechem. Zarówno wyniki badania mikrobiomu jak i konwencjonalna diagnostyka mikrobiologiczna wskazują na prognostyczne znaczenie zakażeń *Moraxella* (zwłaszcza w powiązaniu z zakażeniem rinowirusami). Realizując cele poznawcze i diagnostyczne niektóre badania przeprowadzono w sytuacjach, w których nie są one postępowaniem standardowym, a nawet obarczone są ryzykiem pogorszenia jak płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe w okresie ostrych objawów.

Ogromnym atutem pracy jest, oprócz przedstawienia rzetelnej szczegółowej analizy aktualnej wiedzy, syntetyczne zbiorcze i krytyczne jej podsumowanie z uwypukleniem tego co wiadomo na pewno i wskazaniem jak wiele jest jeszcze do wyjaśnienia.

Podsumowując: badania prowadzone przez Doktoranta dotyczą aktualnego i ciekawego problemu jakim jest określenie roli mikrobiomu dróg oddechowych w patogenezie astmy. Dr Bar przeprowadził udaną próbę oceny mikrobiomu dolnych dróg oddechowych w kondensacie powietrza wydychanego, a więc w materiale wykorzystywanym dotychczas do innych celów, a co bardzo ważne materiał ten pozyskiwany jest metodą nieinwazyjną. W ocenie bakteryjnej mikrobioty zastosował nowoczesne oryginalne metody diagnostyczne.

Opracowany przez Doktoranta warsztat badawczy może być wykorzystany w dalszych badaniach.

Oceniana rozprawa stanowi oryginalny i wartościowy dorobek naukowy. Jest znaczącym osiągnięciem w badaniach nad mikrobiomem u chorych na astmę i stawowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Badania, analiza wyników i ich opracowanie charakteryzuje wysoka jakość, zostały przeprowadzone z dużą starannością. Doktorant dowiódł dobrego przygotowania do prowadzenia badań naukowych. Oceniam rozprawę bardzo wysoko.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.).

Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W oparciu o powyższe podsumowanie zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Anna Bręborowicz

