

dr hab. prof. UJ Anna Ziomkiewicz-Wichary
Profesor w Pracowni Antropologii
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków dnia 20 października 2023 r

Recenzja pracy doktorskiej przedstawionej przez **Panią mgr Aleksandrę Bramorską**
zatytułowaną: *The effect of diet and gut microbiota on cognitive functioning*

Pracę doktorską wykonano w Instytucie Psychologii Szkoły Wyższej Psychologii Społecznej pod opieką promotorską prof. SWPS dr hab. Anety Brzezickiej oraz dr Bartłomieja Balcerzaka. Badania wykonane w ramach pracy zostały sfinansowane w ramach grantu Ministerstwa Edukacji i Nauki (grant nr WP2018/A/90) oraz Regionalnej Inicjatywy Doskonałości (grant nr 012/RID/2018/19).

Ogólna ocena rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Aleksandry Bramorskiej podejmuje niezwykle interesującą z punktu widzenia poznawczego i ważną z punktu widzenia praktycznego tematykę związku sprawności funkcji poznawczych ze składem diety oraz mikroflory jelitowej człowieka. Badania nad mikroflorą jelitową w zakresie jej wpływu na zdrowie fizyczne i psychologiczne człowieka są relatywnie nową i fascynującą dziedziną nauki.

Efektywne funkcje poznawcze warunkują optymalne spożycie pokarmów, wpływając na przyjmowanie posiłków i ich rozmiar. Jednocześnie właściwy skład diety, w rozumieniu odpowiednich proporcji makro- i mikroelementów dostarczanych organizmowi z pożywieniem, ma istotne znaczenie dla funkcjonowania mózgu i sprawności funkcji poznawczych. Zawarte w pożywieniu składniki t.j. węglowodany dostarczają glukozy używanej przez organizm jako podstawowe energetyczne paliwo dla funkcjonowania mózgu. Tłuszcz i kwasy tłuszczowe zwłaszcza te z grupy długołańcuchowych, nienasyconych stanowią budulec dla osłonek mielinowych nerwów, warunkując bezpośrednio przewodnictwo nerwowe oraz prawidłowe widzenie. Opublikowane badania wskazują

również, że niektóre z przyjmowanych składników pokarmowych mogą przyspieszać lub opóźniać związane z wiekiem zmiany w sprawności funkcji poznawczych.

Różnorodność spożywanych składników diety zapewnia różnorodność i skład gatunkowy mikroflory bakteryjnej jelit. Bakterie wchodzące w skład tej mikroflory produkują szereg związków o charakterze neuroprzekazników i neuromodulatorów, które za pośrednictwem osi jelitowo-mózgowej wpływają na funkcje psychiczne, w tym funkcje poznawcze. Zaburzenia metaboliczne t.j. syndrom metaboliczny, cukrzyca, nadwaga i otyłość oraz choroby układu pokarmowego często powiązane z nieprawidłową dietą charakteryzuje stan dysbiozy jelitowej. Dysbiozą jelitową charakteryzują się również zaburzenia i choroby natury psychicznej takie jak schizofrenia, depresja czy autyzm, w której funkcje poznawcze są upośledzone lub zmienione.

W kontekście obserwowanych obecnych zmian demograficznych populacji polskiej, które prowadzą do jej gwałtownego starzenia zdecydowanie zasadnym jest podejmowanie badań nad związkiem pomiędzy starzeniem się, składem diety a sprawnością procesów poznawczych, zwłaszcza że związki te są stosunkowo słabo poznane. Rozprawa doktorska i badania Pani mgr Aleksandry Bramorskiej przyczyniają się do lepszego zrozumienia zagadnienia i niewątpliwie wypełniają luki w wiedzy w tym zakresie.

Pracę doktorską napisano na podstawie analizy danych zebranych w ramach dwóch metodologicznie spójnych badań, w których łącznie przebadano dużą próbę ponad 600 zdrowych osób kontrolując ich nawyki i wzory żywienia oraz skład diety przy użyciu internetowych kwestionariuszy żywieniowych. U uczestników zbadano również sprawność różnorodnych funkcji poznawczych takich jak pamięć, działania arytmetyczne oraz monitorowanie wzrokowe i słuchowe, rotacje umysłowe, uczenie się i uwagę. U podgrupy złożonej z 68 osób określono także skład gatunkowy mikrobioty jelitowej celem zbadania jego związku ze sprawnością wyżej wymienionych funkcji mózgu.

Struktura rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma formę typowej dla psychologii monografii, w której przedstawiono opisy dwóch badań. Wyniki pierwszego badania zostały również przedstawione w postaci artykułu i opublikowane na łamach czasopisma specjalistycznego *Nutrients*, co świadczyć może o ich naukowej dojrzałości oraz istotnym znaczeniu.

Każdy z opisów badań zawiera osobny, specyficzny dla tematyki wstęp, opis metodologii i wyników badań oraz ich podsumowanie. Opisy obu badań poprzedzone są wspólnym dla całej pracy wstępem oraz ogólnymi celami i hipotezami a zakończone

podsumowaniem wyników, ogólną dyskusją i wnioskami. Ogółem na pracę składa się 146 stron, z których ostatnie 36 stanowi spis literatury. Strony od 20 do 46 zawierają teoretyczny wstęp, opis metodologii i wyników oraz ich dyskusję dla badania pierwszego a strony od 47 do 94 odpowiednio te same części dla badania drugiego.

W rozprawie zamieszczono 29 tabel oraz 10 rycin i wykresów przy czym ze względu na anglojęzyczną terminologię ryciny i wykresy zakwalifikowane są do tej samej grupy (graphs). Z numeracji wykresów i rycin wynika, że jest ich 11 podczas gdy w rzeczywistości występuje 10 (brakuje ryciny 4). Zamieszczenie spisów tabel, rycin i wykresów, o których Doktorantka najwyraźniej zapomniała, z pewnością pozwoliłoby na uniknięcie tego potknięcia.

Lista cytowanej literatury zawiera 283 prace opublikowane w latach od 1957 do 2023 co świadczyć może o gruntownej znajomości literatury nie tylko w zakresie najnowszych ale i klasycznych pozycji dotyczących omawianego zagadnienia. Większość artykułów pochodzi z okresu ostatnich dziesięciu lat co z kolei wskazuje na relatywną „świeżość” podejmowanej w pracy tematyki.

Język rozprawy

Rozprawa napisana jest niemal w całości w języku angielskim. Wyjątek stanowią podziękowania oraz streszczenie sporządzone w języku polskim. Styl narracji jest zwarty, logiczny, gramatycznie i językowo na ogół prawidłowy. Stosowane słownictwo odpowiada najczęściej stosowanemu w literaturze naukowej w tej tematyce. Znaczenie niektóre pojęć jak na przykład „energy balance” (str. 13; w. 8) w moim odczuciu nie zostało dokładnie sprecyzowane w kontekście zagadnień poruszanych przez Doktorantkę. Bilans energetyczny (energy balance) rozumiany jest jako stosunek energii wydatkowanej na wysiłek fizyczny i procesy podstawowej przemiany materii (energy expenditure) do energii przyjętej z pożywienia (energy intake). Możliwy jest więc zarówno negatywny jak i pozytywny bilans energetyczny. W związku z tym, że Doktorantka dyskutuje głównie materię związaną z regulacją przyjmowania energii (pokarmów) właściwsze byłoby użycie pojęcia „energy intake” a w odniesieniu do całego procesu, który określa sposób (mechanizm) utrzymywania bilansu energetycznego „energy homeostasis”. Oba pojęcia (energy balance and homeostasis) są komplementarne ale nie identyczne w swoim znaczeniu. Mam wrażenie, że pojęcia te stosowane są w pracy zamiennie a zdefiniowanie ich pozwoliłoby na większą precyzję wypowiedzi.

Podobnie, niedodefiniowane jest pojęcie „pleasurable foods” – można się domyślać, że chodzi o potrawy i produkty wysokoenergetyczne, z dużą zawartością węglowodanów i tłuszczów. Jednak przyjemność odczuwana w związku ze spożywaniem określonych potraw i pokarmów jest kwestią zmienną indywidualnie dlatego definicja tego pojęcia i jej rozumienie przez Doktorantkę powinny się znaleźć w treści pracy.

Szczegółowa merytoryczna ocena pracy

Teoretyczne podłoże pracy opisano w ogólnym **Wstępie** zamieszczonym na stronach od 12 do 19 a następnie w dwóch teoretycznych wstępach do poszczególnych badań. W części tej Doktorantka definiuje pojęcie funkcji poznawczych jako procesów myślenia, uczenia, produkcji i przetwarzania języka, wnioskowania, uwagi, koncentracji, pamięci i procesów wykonawczych. Krótko podnosi tematykę wieku jako czynnika upośledzającego sprawność tych funkcji a także innych czynników, w tym spożywanej diety, które wpływają na tę sprawność. Koncentruje się na wzajemnych interakcjach pomiędzy spożyciem pokarmów i funkcjami poznawczymi wskazując na ich dwustronny kierunek. Przedstawia również neurofizjologiczne podstawy regulacji odczuwania głodu i sytości zwracając uwagę na znaczącą rolę poszczególnych składników odżywczych w tym procesie a także rolę sztucznie wprowadzonych w procesach przemysłowych stymulantów i zastępników węglowodanów prostych (słodzików) w zaburzeniach percepcji kaloryczności pożywienia. Podkreśla wagę sposobu odżywiania jako czynnika wpływającego na uczenie się i pamięć w ciągu życia wskazując na negatywny efekt spożywania nadmiernej ilości tłuszczów i węglowodanów prostych na uczenie się i pamięć. Omawia zagadnienia związane z mikrobiomem jelitowym, jego składem oraz czynnikami go kształtującymi. Przytacza wreszcie dotychczas opublikowane wyniki badań dotyczących wpływu składu mikrobioty na funkcje poznawcze. Czyniąc to wszystko Doktorantka opiera się na wynikach szerokiej gamy badań przeprowadzonych zarówno u ludzi na różnych etapach życia jak i na modelach zwierzęcych. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o graficzne zilustrowanie chociaż części z diskutowanych mechanizmów. Myślę, że ułatwiłoby to percepcję tego obszernego i w sumie dosyć zawiązanego materiału.

Wśród ogólnych **celów** rozprawy mgr Bramorska wymienia zbadanie związku pomiędzy nawykami żywieniowymi i składem mikrobioty jelitowej a funkcjonowaniem poznawczym u dorosłych osób, w różnym wieku, z populacji generalnej. Cel ten zostaje uszczegółowiony w ramach hipotezy z badania pierwszego dotyczącej negatywnego wpływu spożycia produktów „niezdrowych” na związany z wiekiem spadek sprawność funkcji

poznawczych a w szczególności pamięci oraz hipotez z badania drugiego dotyczących różnic w sprawności tych funkcji w zależności od diety i moderującego efektu mikrobioty jelitowej. Pewne wątpliwości budzi hipoteza 2 z drugiego badania wg której zdrowa mikrobiota może łagodzić negatywny efekt „nieprawidłowej” diety w odniesieniu do funkcji poznawczych. W związku z tym, że jakość mikrobioty w dużym stopniu pozostaje pod wpływem diety, osoby o „nieprawidłowej” diecie z reguły posiadać będą również dysbiotyczną mikrobiotę. Czy w ramach przeprowadzonej analizy udało się zidentyfikować osoby, które pomimo „niezdrowej” diety posiadały zbalansowaną mikrobiotę?

W **metodologii** obu badań do opisu diety użyto narzędzi internetowych. Narzędzia te stanowiły: walidowany dla polskiej populacji kwestionariusz częstości spożycia poszczególnych pokarmów w okresie ostatniego roku (FFQ), bieżącego 24-godziennego spisu spożywanych produktów i posiłków w ciągu trzech wybranych dni tygodnia (2 dni w ciągu 5 roboczych dni i 1 dzień w trakcie dni wolnych) oraz kwestionariusz urozmaicenia spożycia żywności (FIVEQ). W mojej ocenie metody te zostały wybrane poprawnie jednak ich wybór nie został w pełni uzasadniony. Wartość retrospektywnych kwestionariuszy częstości spożycia zwłaszcza w tak długich okresach czasu (1 rok) jako narzędzi do trafnego opisu diety jest często kwestionowana w literaturze ze względu na tendencję badanych do zawyżania częstości spożycia produktów „zdrowych” i zaniżania produktów „niezdrowych” oraz błąd przypominania. Dużo lepsze w tym względzie wydają się wywiady 24-godzinne lub prospektywna metoda spisywania spożytych posiłków i produktów „na bieżąco”. Metody te mogą nie dawać jednak informacji na temat całościowej oceny spożywanej diety i wzorów żywienia. W związku z tym najczęściej w dużych badaniach przekrojowych kwestionariusze częstości długoterminowego spożycia (FFQ) stanowią właściwie jedyną alternatywę, zwłaszcza w warunkach gdy badania te odbywają się on-line. Wybór narzędzia do opisu diety nie został w mojej ocenie należycie w pracy uzasadniony, nie przedyskutowano również konsekwencji wyboru tych narzędzi dla możliwych błędów w oszacowaniu diety i nawyków żywieniowych badanych osób.

Skład mikrobioty jelitowej zbadano w podgrupie 68 uczestniczek badań, na podstawie pojedynczych próbek kału, z których izolowano i sekwencjonowano DNA bakteryjny i identyfikowano taksony bakterii do poziomu rodzaju. Analizy te przeprowadzono w Centrum Medycznym MedGen w Warszawie. Z przedstawionego opisu nie można stwierdzić ani o jakiej porze ani w jaki sposób pobrano próbki kału. Ponieważ zarówno sprawność funkcji poznawczych jak i skład mikrobioty podlega zmianom okołodobowym czy czynnik pory przeprowadzenia badania był kontrolowany? Ponadto z opisu metodologicznego wynika, że

próbki kału pobierano do 3 miesięcy od momentu wypełnienia kwestionariuszy dietetycznych i stylu życia oraz zdrowia. W jaki sposób kontrolowano stan zdrowia w momencie pobrania próbki kału? Ponieważ kryterium włączenia do badań mikrobioty stanowiły według opisu jedynie różnice w diecie oraz kryteria związane z funkcjami poznawczymi nie jest jasne czy uczestniczące w badaniu kobiety mogły cierpieć na choroby metaboliczne, zażywać antybiotyki lub probiotyki. Wszystkie te czynniki mogą mieć istotne znaczenie dla składu mikrobioty i zakłócać związek pomiędzy sprawnością funkcji poznawczych, dietą i składem bakterii. Nie jest również do końca jasne w jakich warunkach próbki przechowywano i jak długo od momentu pobrania nastąpiła analiza laboratoryjna (skoro próbki od 54 uczestniczek były badane najpierw a po 3 miesiącach od następnych 14 osób – *Fecal Sample Collection*, str 58).

Badania sprawności funkcji poznawczych dokonano w obu badaniach on-line, przy pomocy baterii standardowych testów komputerowych i typu papier-ołówek. W związku z tym, że nie jestem specjalistką w zakresie eksperymentalnego badania sprawności funkcji poznawczych nie jestem w stanie szczegółowo wypowiedzieć się na temat poprawności każdej z przeprowadzonych procedur. Godna podkreślenia jest mnogość zastosowanych w obu badaniach testów służących ocenie sprawności poznawczych. Moje zastrzeżenia budzi natomiast brak kontroli pory przeprowadzenia testów ze względu na okołodobową zmienność ich wyników.

W **wynikach** przeprowadzonej przez Doktorantkę zaawansowanej analizy statystycznej, zgodnie z hipotezą badania udało się wykazać, że wzrastający wiek badanych związany był ze spadkiem sprawności ich funkcji poznawczych jednak częstość spożywania zdrowych produktów łagodziła ten spadek. Efekt ten zaznaczony był najwyraźniej w przypadku sprawności wybranych procesów pamięciowych i częstości spożywania białego mięsa i ryb. Spożywanie czerwonego mięsa i tłuszczu zwierzęcego powiązane było natomiast z przyspieszeniem związanego z wiekiem spadku sprawności procesów pamięciowych. W ramach badania związku konsumowanej diety ze sprawnością funkcji poznawczych i składem mikrobioty Doktorantka wykazała również, że częstość spożycia mięsa w połączeniu z podwyższonym otluszczeniem ciała wpływała negatywnie na procesy rotacji umysłowych oraz, że spożywanie pokarmów typu Fast Food było związane negatywnie z pamięcią epizodyczną. Nie udało się natomiast wykazać żadnego związku pomiędzy spożywaniem diety typu Fast Food a różnorodnością rodzajów bakterii w mikrobiocie mimo, że sama różnorodność wpływała pozytywnie na sprawność pamięci epizodycznej. Wyniki te nie potwierdzają więc postawionej przez Doktorantkę hipotezy o moderującym wpływie

mikrobioty na związek pomiędzy dietą a sprawnością funkcji poznawczych. W analizach, których celem było zidentyfikowanie rodzajów bakterii związanych ze sprawnością funkcji poznawczych zaobserwowała bliską istotności korelację pamięci epizodycznej z bakteriami z rodzaju *Senegalimassilia*.

Wyniki badania zostały zinterpretowane w świetle literatury w ogólnej Dyskusji oraz podsumowane w kończących pracę Wnioskach. Poza porównaniem otrzymanych wyników z opublikowanymi pracami Doktorantka wskazała na potencjalne neuroanatomiczne struktury (hipokamp) oraz patologiczne mechanizmy (osłabienie integralności bariery krew-mózg, zaburzony metabolizm węglowodanów związany z cukrzycą oraz rozwój procesów zapalnych w otyłości) odpowiedzialne za spadek sprawności funkcji poznawczych obserwowany w reakcji na nieprawidłową dietę opartą na konsumpcji produktów typu Fast Food oraz dużej ilości czerwonego i tłuszców zwierzęcych. Podobne rozważania zostały zawarte w odniesieniu do wyników w zakresie związku sprawności funkcji poznawczych z różnorodnością i składem mikrobioty.

Dużym atutem pracy, który został również podkreślony w dyskusji jest przeprowadzenie badania na dużej próbie osób zdrowych, pochodzących z generalnej populacji Polski, podczas gdy duża liczba opublikowanych w literaturze badań koncentruje się na próbach diagnozowanych klinicznie bądź to w zakresie chorób układu nerwowego (demencja, choroba Parkinsona, depresja) lub chorób metabolicznych (otyłość, cukrzyca, syndrom metaboliczny). Takie podejście pozwala na formułowanie bardziej ogólnych zaleceń dietetycznych dotyczących konsumpcji produktów, które mogą pomóc opóźnić procesy starzenia poznawczego u zdrowych osób.

Podsumowując, praca przedstawiona do recenzji porusza niezwykle aktualne i ważne z punktu widzenia praktycznego zagadnienie związku pomiędzy jakością spożywanej diety a sprawnością funkcji poznawczych. Uzupełnia wiedzę w tym zakresie poprzez nowatorskie ujęcie tego zagadnienia z perspektywy bakteryjnego składu mikrobioty i jego związku z funkcjami poznawczymi. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania w niezwykle trudnym, okresie pandemii COVID-19 wskazują na jej doskonale przygotowanie do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej.

W związku z powyższym uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt: *The effect of diet and gut microbiota on cognitive functioning* autorstwa Pani mgr **Aleksandry Bramorskiej** spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. Nr 2018 poz. 1668)

stawiane pracom doktorskim. Wnoszę więc o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Bramorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. prof. UJ

Anna Ziomkiewicz-Wichary

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ziomkiewicz-Wichary', written in a cursive style.

Pracownia Antropologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

Uniwersytet Jagielloński