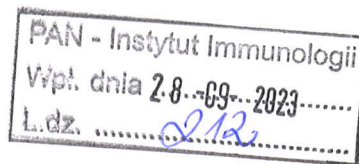




UNIwersytet  
PRzyrodniczy  
WE WROcławiu



KATEDRA GENETYKI  
WYDZIAŁ BIOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT

Dr hab. inż. Magdalena Zatoń-Dobrowolska, prof. uczelni  
Katedra Genetyki  
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
ul. Koźuchowska 7, 51-631 Wrocław

Wrocław, dnia 26.09.2023 r.

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej**

**pt. „Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu”**  
zrealizowanej pod kierunkiem dr hab. Łukasz Łaczmąńskiego, prof. PAN i promotora  
pomocniczego dr n. med. Pawła Karpińskiego wykonana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu  
Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

Zaburzenia ze spektrum autyzmu według licznych danych są coraz częściej występującą i diagnozowaną jednostką chorobową w społeczeństwach. Jednak ze względu na duże zróżnicowanie w zakresie objawów i ich nasilenia, a także skomplikowane podłoże, które nie do końca jest poznane, konieczne są badania, które pozwolą lepiej zrozumieć uwarunkowania ASD, jak również poznać czynniki, które mogą wpływać na typ i stopień nasilenia objawów. Prowadzone liczne badania na temat mikrobioty jelitowej wskazują, że może ona odgrywać istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Zarówno skład gatunkowy mikroorganizmów, jak i ich wzajemne zależności czy proporcje mogą przekładać się na jakość przebiegających procesów, jak również aktywność genów czy ścieżek sygnalizacyjnych. Wiele wyników, zarówno w przypadku człowieka, jak i zwierząt, wskazuje na istotne różnice w mikrobiocie w przypadku występowania wielu chorób w porównaniu do osób czy osobników zdrowych, np. w przypadku otyłości, cukrzycy.



Coraz szersze spektrum nowoczesnych metod i technik badawczych jak RT-PCR czy sekwencjonowanie umożliwiają coraz dokładniejsze badania w tym zakresie i pozwalają na coraz lepszą identyfikację gatunkową mikroorganizmów, a przez to określenie ich roli i powiązanie z funkcjami organizmu czy występującymi zaburzeniami. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w związku z tym w aktualne nurty badawcze, zwłaszcza w kontekście holistycznego podejścia do funkcjonowania organizmu oraz możliwych uwarunkowań występujących chorób.

### **1. *Syntetyczna charakterystyka recenzowanej rozprawy***

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska ma charakter eksperymentalny. Napisana została w sposób czytelny i zrozumiały, poprawny od strony językowej. Ma ona układ typowy dla prac o takim charakterze. Całość pracy zawarta jest na 187 stronach i składa się z siedmiu rozdziałów „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Bibliografia” (niestety brakuje jej w spisie treści). Dodatkowo praca została uzupełniona streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem skrótów, spisem rysunków i spisem tabel oraz Dodatkiem. W pracy zostało także zamieszczone Oświadczenie bioetyczne, co jest istotne w związku z charakterem badań.

### **2. *Analiza poszczególnych części pracy***

W rozdziale „Wstęp”, który obejmuje także przegląd aktualnego piśmiennictwa, na początku Autorka szczegółowo przedstawiła zagadnienie autyzmu, jego etiologię i epidemiologię. Pozwala to lepiej zrozumieć złożoność zagadnienia. W drugiej części rozdziału omówione zostały badania dotyczące mikrobioty, zwłaszcza w kontekście występowania zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD). W trzeciej części poruszono powiązaną z funkcjonowaniem mikroorganizmów jelitowych kwestię krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SFA).

Rozdział „Cel pracy” zawiera przedstawiony główny cel pracy.



Rozdział „Materiały i metody” jest bardzo dobrze i szczegółowo opisany, zawiera się na 37 stronach, co samo w sobie wskazuje na bardzo duży zakres zarówno zgromadzonego materiału, jak i zastosowanych metod badawczych. Scharakteryzowano szczegółowo zarówno uczestników badania i grupy badawcze, jak i zgromadzony materiał, który następnie był poddany analizom. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt zgromadzenia dużych i różnorodnych danych, które pozwalają na kompleksowe podejście do analizy zagadnienia. Kolejno zostały opisane zastosowane metody molekularne wykorzystane do analizy mikrobioty w próbkach kału, co zostało wzbogacone schematami obrazującymi przebieg procedury. Omówiono wykorzystane metody bioinformatyczne w analizie uzyskanych w ramach wcześniejszych metod wyników. Szczegółowo omówiono także etapy analizy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w pobranych próbkach. Ostatnią część tego rozdziału stanowi przedstawienie analizy danych ankietowych.

Uzyskane liczne wyniki zostały szczegółowo omówione z podziałem na poszczególne etapy badań i przedstawione głównie na wykresach. Widoczne są dwie główne, wyróżniające się części wyników – jedna dotyczy analiz molekularnych oraz z zakresu bioróżnorodności mikrobiomu w wyróżnionych grupach badawczych, natomiast drugą stanowi analiza uwarunkowań dietetycznych oraz występujących dolegliwości ze strony układu pokarmowego w grupach dzieci. Poszczególne wyniki przedstawiono w wyróżnionych podrozdziałach w kolejności zgodnej z przedstawionymi etapami badań w rozdziale „Materiały i Metody”, co bardzo ułatwiło ich analizę. W kolejnym rozdziale pracy mgr Paulina Żebrowska-Róžańska przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników z wynikami badań innych autorów, wykazując podobieństwa i różnice, co zostało wzbogacone także próbą wyjaśnienia przyczyn występujących rozbieżności. W tym rozdziale także zostały wyróżnione części, które odnosiły się do danej grupy uzyskanych wyników.

W pracy w rozdziale 6 przedstawiono 12 wniosków wynikających z przedstawionych badań.

Bibliografia obejmuje 275 pozycji literatury, głównie zagranicznej.



Dysertacja została wzbogacona o Dodatek, w którym przedstawiono dodatkowe wyniki.

### 3. *Uwagi krytyczne*

Wskazanie ewentualnych nieścisłości, zarówno formalnych jak i merytorycznych, należy do zadań recenzenta. Odnotowane nieścisłości zostały przedstawione poniżej zgodnie z kolejnością części dysertacji:

- ✓ W opisie epidemiologii ASD według mnie brakuje przedstawienia także danych dla krajów europejskich, w szczególności dla Polski. Jest to o tyle istotne, że badania były realizowane na populacji polskiej, która może się znacząco różnić od populacji amerykańskiej pod względem choćby częstości diagnozowania autyzmu.
- ✓ Co Autorka miała na myśli wymieniając warianty genetyczne i warianty genów przy omawianiu czynników genetycznych warunkujących autyzm?
- ✓ Przy omawianiu czynników genetycznych Doktorantka napisała, że „... międzynarodowe badanie wykazało,....., że ASD ma szacowaną dziedziczność na poziomie 80%” (str. 22), natomiast w badaniu szacowano odziedziczalność nie dziedziczność, to jest całkiem inne pojęcie. Ten sam błąd powielony został także w kolejnym akapicie, w którym brakuje także wskazania w podpunkcie b) czego dotyczą podane procenty – w cytowanej publikacji chodzi o wskaźnik rozpowszechnienia ASD.
- ✓ Przy makroskładnikach diety raczej powinno się mówić o energii niż o kaloriach, ponadto energia nie jest makroskładnikiem, jest raczej wartością charakteryzującą dietę (str. 29).
- ✓ Przy omawianiu kwasu propionowego chyba raczej chodziło Autorce o rozwój układu nerwowego niż rozwój nerwową płodu (str. 37).
- ✓ W opisie analiz danych ankietowych podane są wykorzystywane metody statystyczne, natomiast brakuje wskazania, w jakim programie zostały te analizy przeprowadzone.
- ✓ W Wynikach w podrozdziale 4.2 na początku przydałoby się według mnie omówienie wyników sekwencjonowania oraz podanie informacji na temat liczby taksonów oznaczonych w poszczególnych grupach.



- ✓ Brakuje omówienia wyników uzyskanych w ramach analizy przewidywalnych funkcji metabolicznych mikrobiomu, zostały one jedynie zamieszczone w formie wykresów w Dodatku. Są one jednak być bardzo ciekawe i dobrze by było je omówić.
- ✓ Numeracja wykresów 4.6-4.8 powinna być zgodna z kolejnością ich omawiania, a najpierw jest w tekście odniesienie do wykresu 4.8, potem 4.7, a na końcu 4.6.
- ✓ W podrozdziale 4.5.0.2 i 4.5.0.3 może lepiej byłoby wyliczać procentowy udział poszczególnych typów ukształtowania oraz koloru stolca bez uwzględniania dni bez wypróżnień. Wcześniejsza analiza wykazała, że jest to element różnicujący grupy, więc może wpływać na wyniki analizy tych dwóch elementów. Ponadto jeżeli nie ma wypróżnienia, to nie ma jak analizować tych dwóch cech stolca. Być może takie podejście pozwoliłoby bardziej uwidocznienie różnice między grupami, które w obecnej analizie może zaburzać udział dni bez wypróżnień.
- ✓ Trochę brakuje mi i może warto by było się pochylić nad analizą powiązania składu mikrobiomu a występowaniem dolegliwości ze strony układu pokarmowego albo dietą i SFA w poszczególnych grupach.
- ✓ W Dyskusji Autorka zastosowała inną kolejność poruszanych zagadnień niż w wynikach. Lepiej by się analizowało pracę, gdyby kolejność w obu rozdziałach była taka sama.
- ✓ Wniosek 6 i 7 są praktycznie identyczne, siódmy jest jedynie bardziej rozbudowany.
- ✓ Część wniosków stanowi podsumowanie pracy np. wniosek 2, 5, 6, 9.

Przedstawione uwagi mają charakter polemiczny i mogą stanowić ewentualne sugestie, natomiast nie obniżają wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji. Zastosowane przez mgr Paulinę Żebrowską-Różańską szerokie spektrum metod badawczych wskazuje na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego, jak również przygotowanie merytoryczne, a przeprowadzona analiza i interpretacja wyników na posiadane kompetencje w tym zakresie.

#### 4. *Ocena merytoryczna rozprawy*



Przedłożona dysertacja ma charakter eksperymentalny. Autorka do jej realizacji zastosowała nowoczesne metody badawcze, a uzyskane różnego charakteru dane umiejętnie przeanalizowała z wykorzystaniem kompleksowych narzędzi statystycznych i bioinformatycznych. Przedstawione opracowanie pozwala stwierdzić, że Pani Paulina Żebrowska-Różańska umiejętnie posługuje się zarówno technikami z zakresu genetyki molekularnej, jak i narzędziami wykorzystywanymi do analizy uzyskiwanych w ich wyniku danych.

Praca doktorska Pani Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej ma dużą wartość poznawczą, a na szczególne podkreślenie zasługuje:

- Zebrany bardzo zróżnicowany materiał badawczy, który pozwala na bardzo kompleksową analizę.
- Zastosowanie odpowiednio dobranych metod analitycznych i umiejętną analizę oraz interpretację ich wyników.
- Wskazania cech mikrobiomu oraz czynników dietetycznych, które mogą mieć związek z ASD, czy też wpływać na występowanie dodatkowych zaburzeń zdrowotnych towarzyszących ASD.
- Wskazanie istotności kompleksowego podejścia do poszukiwania czynników odgrywających ważną rolę w nasileniu autyzmu i towarzyszących mu innych dolegliwościach.

Ze względu na istotność problemu występowania zaburzeń ze spektrum autyzmu, a także złożone i nie do końca poznane podłoże tej choroby, poruszany w pracy problem i uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w pogłębienie istniejącej wiedzy dotyczącej ASD.

## **5. Podsumowanie i wnioski końcowe**

Dysertacja doktorska mgr Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej zatytułowana „**Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu**” spełnia warunki



UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

KATEDRA GENETYKI  
WYDZIAŁ BIOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT

określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.).

Uwzględniając wartość merytoryczną ocenianej dysertacji doktorskiej uważam, że stanowi ona osiągnięcie naukowe spełniające kryteria postawione pracom naukowym w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej do dalszych etapów postępowania w Szkole Doktorskiej w sprawie nadania stopnia doktora.

W związku z wysoką wartością merytoryczną pracy, bogactwem uzyskanych istotnych wyników, kompleksowym podejściem oraz walorem poznawczym pracy doktorskiej Pani Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

*Dr hab. inż. Magdalena Zatoń-Dobrowolska, prof. uczelni*

*Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt*

