

Bydgoszcz, 01.10.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marzena Anna Lewandowska, MBA  
Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów  
Wydział Lekarski, Collegium Medicum  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Kierownik Zakładu Genetyki i Onkologii Molekularnej  
Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy  
[lewandowskam@co.bydgoszcz.pl](mailto:lewandowskam@co.bydgoszcz.pl)

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Pauliny Marii Żebrowskiej – Różańskiej**

**pt. „Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu”**

Rozprawa pt. „Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu” została zrealizowana pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Łukasza Łaczmąńskiego, prof. PAN oraz promotora pomocniczego dr. n. med. Pawła Karpińskiego w laboratorium Genomiki i Bioinformatyki, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo zastępcy Dyrektora ds. naukowych ILTD PAN – Prof. dr. hab. n. med. Jolanty Łukasiewicz z dnia 07.08.2023 roku, zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Instytutu w 214 posiedzeniu przeprowadzonym w dniu 15 czerwca 2023.

Na dniach została przyznana Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny dla Katalin Karikó i Drew Weissman "za odkrycia dotyczące modyfikacji zasad nukleozydowych, które umożliwiły opracowanie skutecznych szczepionek mRNA przeciwko COVID-19". Obserwujemy, że zastosowanie technik biologii molekularnej w wirusologii i mikrobiologii staje się coraz częstsze i adekwatnie znacząco poszerza możliwości transferu wiedzy. Tym samym możliwym się staje wdrożenie tej wiedzy z zakresu nauk podstawowych do praktyki klinicznej, tak jak to można było zaobserwować z bezprecedensowo szybkim opracowaniem szczepionek mRNA podczas pandemii COVID-19. Zakres epidemiologii klinicznej również zmienił się wraz z rozwojem nauki, znaczącym obniżeniem kosztów sekwencjonowania nowej generacji, jak również z doświadczeniem pandemii. Prowadzone są badania zarówno szerokoskalowe systematyczne prowadzące do powstania ogólnosiwiatowych katalogów np. mikrobiomów miejskich pozwalające lepiej zrozumieć zjadliwości i oporności na antybiotyki społeczności drobnoustrojów specyficznych dla dużych miast w różnych krajach, czy globalnych atlasów metagenomicznych, które

umożliwiają odkrywanie nowych organizmów i genów, podkreśla potencjalne zastosowania w zdrowiu publicznym i kryminalistyce. Z drugiej strony prowadzone są również specjalistyczne badania składu mikroflory jelitowej. Wykorzystując technologię NGS, współczesne badania metagenomiczne wykazały, że choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy autyzm charakteryzuje się zmianami w różnorodności drobnoustrojów jelitowych, co więcej zaproponowano system komunikacji określany, jako oś jelito-mikrobiota-mózg. Biorąc po uwagę powyższe, podjęte przez doktorantkę badania mające na celu ustalenie mikrobioty i wykazaniu różnic i określenie potencjalnego związku z zaburzeniami ze spectrum autyzmu - wpisuje się w najnowsze trendy.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej badania skupiły się na analizie składu mikrobioty jelitowej na podstawie analizy próbek stolca w trzech grupach: u 71 dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ich neurotypowego rodzeństwa (n=29) oraz grupie kontrolnej niespokrewnionych neurotypowych dzieci (n=44). Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę składu mikrobioty fekalnej, ocenę diety i dolegliwości jelitowych w badanych grupach. Równolegle do analiz z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji – metody szeroko stosowanej do oceny mikrobioty - przeprowadziła analizę zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, jako potencjalnego markera aktywności metabolicznej mikrobioty.

Rozprawa liczy 187 stron i składa się z 6 głównych rozdziałów i 3 dodatkowych w układzie typowym dla prac doktorskich. Właściwy tekst jest uzupełniony streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem skrótów i informacją o zgodzie komisji bioetycznej, oraz na końcu rozprawy spisem rysunków i spisem tabel. Warty uznania jest fakt że Doktorantka dołączyła również imponującą listę publikacji. Doktorantka jest współautorką 8 publikacji o imponującym łącznym współczynniku oddziaływania tznw Impact Factor = 36,023.

Piśmiennictwo obejmuje 275 pozycji literaturowych, gdzie większość z nich jest opublikowana po 2000 roku - świadczy to o staranności doboru literatury. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zaznaczyć, że doktorantka nie stosuje spójnego stylu dla cytowani: część autorów jest cytowana z pełnym imieniem i nazwiskiem np. 55-68;109, 116 a w innych pozycjach, cytowani tylko z pierwszą litera imienia 69, 78, 79, 80; 111-115.

Cała rozprawa napisana z dość dużą szczegółowością, ale jednocześnie prace czyta się lekko. Liczący 22 stron wstęp jest logicznie podzielony na 3 podrozdziały opisujące zaburzenia ze spectrum autyzmu, dotychczasowe badania nad mikroblem u tych pacjentów i opis funkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w organizmie człowieka – proponuje przeredagować nazwę ostatniego podrozdziału – obecna jest zbyt metodologiczna.

Hipotezy i cele badawcze zostały jasno sformułowane.

W kolejnym rozdziale Doktorantka Paulina Maria Żebrowska-Różańska na 37 stronach rozdziału 3 opisuje szczegółowo materiały i metody swojej pracy badawczej. Grupy badawcze są dobrze dobrane i ich reprezentatywność jest wystarczająca, aby uzyskać istotności w analizach statystycznych.

Technologia sekwencjonowania nowej generacji (NGS) pogłębiła naszą wiedzę na temat ludzkiego mikrobiomu, pozwalając nie tylko na charakterystykę znanych mikroorganizmów, ale również umożliwiając odkrycie i scharakteryzowanie drobnoustrojów trudnych do hodowli wraz z przewidywaniem ich funkcji. Najczęściej używane metody NGS obejmują sekwencjonowanie genu 16S rRNA, sekwencjonowanie metagenomiczne typu shotgun i sekwencjonowanie RNA. Doktorantka szczegółowo opisała sekwencjonowanie DNA, ze szczególnym uwzględnieniem 16S rRNA oraz bardzo szczegółową analizę bioinformatyczną z sekwencjonowania: przygotowanie danych, odszumianie i łączenie, łączenie wyników z regionów V3-V4 i V7-V9, różnorodność alfa, różnorodność beta, analizę różnic w obfitości kończąc na przewidywaniu funkcji metabolicznych mikrobiomu. Metoda bioinformatyczna została przedstawiona w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący. Tematyka jest bezpośrednio związana z tematem pracy doktorskiej, ale jest duża szczegółowość, liczne odniesienia do literatury w metodologii, szczegółowe opisy zalet sekwencjonowania wielu krótkich regionów. Z jednej strony należą się słowa uznania dla Doktorantki, która w sposób bardzo jasny i przejrzysty wytłumaczyła profilowanie taksonów bakterii znajdujących się w próbce podczas jednej analizy i sklasyfikowała oraz scharakteryzowała drobnoustroje dzięki technologii NGS. Z drugiej strony zamiast tak rozbudowanego rozdziału materiały i metody – znaczną treść tego rozdziału można by umieścić w pracy przeglądowej na temat badań NGS nad ludzkim mikrobiomem czy zastosowania różnych narzędzi bioinformatycznych na potrzeby analiz zarówno całkowitego ładunku mikrobiologicznego z próbek jak i jakościowego. Do wykorzystania tych treści i przygotowania manuskryptu Doktorantkę gorąco zachęcam, aby szersza skala czytelników mogła zapoznać się z tak dobrym omówieniem sekwencjonowania 16S rDNA.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny dzięki logicznym podrozdziałom i przedstawieniu wyników w formie licznych kolorowych rycin, analiz porównawczych, diagramów PCA (analiz głównych składowych), wykresów pudełko-wąsy. Należy tutaj podkreślić czasochłonność tych analiz oraz szczegółowość opisów np. w analizach różnic w obfitości taksonów bakteryjnych między badanymi 3 grupami - gdy identyfikacja na poziomie rodzaju była niemożliwa – wskazano pierwszy dostępny poziom taksonomiczny gdzie była dostępna klasyfikacja. Podobnie – w sposób jasny zostały przedstawione wyniki analiz diety uczestników, która obejmowała aż 93 parametry i składniki odżywcze. Kolorowe wykresy przedstawiające procentowe podsumowanie zaliczeń każdego parametru - ułatwiły trudną do zwizualizowania analizę dolegliwości ze strony układu pokarmowego.

W dyskusji doktorantka krytycznie zestawia wyniki swojej pracy badawczej z danymi literaturowymi, podkreślając wiarygodność swoich wyników, bardzo dobrze skonstruowane grupy badawcze odzwierciedlające rzeczywistość kliniczną (np. wyższy udział procentowy chłopców w grupie dzieci z autyzmem zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi że zaburzenia ze spektrum autyzmu 4x częściej są diagnozowane u chłopców). Doktorantka konfrontuje swoje wyniki z hipotezą wpływu stresu i lęku u dzieci z ASD na funkcjonowanie układu pokarmowego; jednocześnie wskazuje, że stosowanie antybiotyków w ciągu ostatnich 3 miesięcy nie różnicowało grup, tym samym zwiększa to wiarygodność jej wyników badań.



Doktorantka wykazała zarówno umiejętność pracy z trudnym materiałem biologicznym, jak i szerokie kompetencje w zakresie technik biologii molekularnej ( NGS) czy technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) o dużej dojrzałości naukowej świadczy też fakt, że na 3 stronach dyskutuje ograniczenia swoich badań. Dyskusje kończy 11 wnioskami sformułowanymi adekwatnie do uzyskanych wyników.

Moje uwagi recenzenta są głównie natury redakcyjnej w związku z drobnymi niedociągnięciami edytorskimi. Doktorantka powinna zwrócić uwagę na

- pominięte piśmiennictwo w spisie treści
- poprawić drobne błędy, literówki np. str. 80 - jest „se spectrum”, powinno być „ze spectrum”; str. 150, piśmiennictwo 56 – tytuł czasopisma jest: „nature” powinno być „Nature”; Piśmiennictwo 57, 65 – nie prawidłowy symbol w tytule czasopisma; powinien być symbol &
- ujednoczyć bibliografię
- zmniejszyć drobne powtórzenia tych samych treści przedstawionych we wynikach (np. str 90) i dyskusji (np. strona 126)
- tak pracochłonna analiza bioinformatyczna opisana w metodologii mogłaby być ubogacona a jednocześnie zwizualizowana przez schemat całej procedury analizy bioinformatycznej
- spis rysunków, tabel – ułatwiłyby czytanie gdyby były przy spisie treści a nie na końcu rozprawy
- skrócenie treści 11 wniosków i ilości wniosków (np. wniosek numer 1 nie był bezpośrednio związany z celem pracy i mógłby być pominięty)

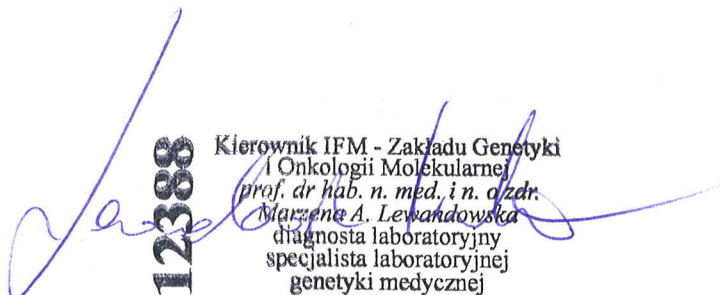
Te drobne błędy nie zmieniają oczywiście mojej merytorycznej oceny pracy i nie umniejszają osiągnięć naukowych zaprezentowanych przez Doktorantkę. Temat podjęty przez mgr Paulinę Żebrowską-Róžańską jest ciekawy, unikalny a „dodatek” składający się z listy publikacji (str.186-187) o łącznym IF=36,024 podkreśla unikalność tematyki badawczej oraz szeroka gamę projektów, w których wiedza bioinformatyczna doktorantki została równolegle wykorzystana. Promotor zadbał o wszechstronne wykorzystanie wiedzy i umiejętności doktorantki nabytej podczas pracy badawczej-doktorskiej, tym samym pozwolił rozwinąć się doktorantce analizując mikrobiotę jelitową nie tylko u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ale również u osób dorosłych ze schizofrenią, astmą czy poszerzył je o metody analizy danych poprzez uczenie maszynowe; tym samym Doktorantka dała się poznać, jako osoba z którą łatwo się współpracuje w projektach naukowych i potrafi dzielić się swoją wiedzą i umiejętnościami.

Podsumowując swoją opinię o rozprawie doktorskiej, chciałabym jednoznacznie stwierdzić, że bardzo wysoko oceniam jej poziom naukowy. Ponadto, połączenie wiedzy mikrobiologii, genetyki, dietetyki, jak i chemii analitycznej wskazuje na szeroki wachlarz technik zarówno eksperymentalnych, jak i „in silico”, a to świadczy, że Doktorantka jest doświadczonym naukowcem. Liczne publikacje opublikowane przez złożeniem pracy świadczą zarówno o znakomitej relacji naukowej promotor-doktorant, dzięki której możliwe było przez

promotora odkrywanie i rozwijanie potencjału doktorantki, a w późniejszych latach - dojrzałości naukowej doktorantki.

### **Wniosek końcowy**

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej zatytułowana „Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu” spełnia warunki 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 interdyscyplinarnej pracy, bogactwem uzyskanych istotnych wyników, oraz możliwościami aplikacyjnymi oraz dodatkowo biorąc po uwagę bardzo duży dorobek naukowy doktorantki Pani Pauliny Żebrowskiej-Różańskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

  
12388  
Kierownik IFM - Zakładu Genetyki  
i Onkologii Molekularnej  
prof. dr hab. n. med. i n. o.zdr.  
Marzena A. Lewandowska  
diagnosta laboratoryjny  
specjalista laboratoryjnej  
genetyki medycznej

