



UNIWERSYTET MEDYCZNY w Lublinie
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. (fax) 81-448-71-00

Lublin, 21.04.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Pecyny pt. „Charakterystyka i określenie roli elementu bakteryjnego mikrobiomu jelit w etiologii jelita drażliwego z zastosowaniem sekwencjonowania 16S rRNA” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej, Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Marzeny Gajęckiej oraz promotora pomocniczego - dr n. med. Doroty Nowak-Malczewskiej.

Podstawa wykonania recenzji

Podstawą wykonania recenzji rozprawy doktorskiej było pismo Kanclerza Kolegium Nauk Farmaceutycznych prof. dr hab. Judyty Cieleckiej-Piontek z dnia 28.02.2022 roku wystosowane zgodnie z uchwałą nr 17/2022 Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, z dnia 25. 02.2022 r. Przewód doktorski prowadzony jest w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest oprawionym wydrukiem komputerowym formatu A4 liczącym 206 ponumerowanych stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i składa się z 6 rozdziałów głównych i rozdziału ze spisem piśmiennictwa, obejmującego 283 pozycji literaturowych, krajowych i zagranicznych. Piśmiennictwo jest uporządkowane według kolejności cytowania. Podkreślić należy bogaty materiał dokumentacyjny wyników badań, na który składają się tabele w liczbie 23 oraz 21 rycin. Pozostałe 9 tabel i 4 ryciny stanowią graficzne przedstawienie treści zawartych we Wstępie i Metodach pracy. Ponadto, zamieszczone na wstępie dysertacji, wykaz używanych skrótów stosowanych w pracy, oraz na końcu wykazy tabel i rycin organizują poruszanie się po poszczególnych częściach pracy. W recenzowanej pracy zamieszczono także streszczenie

w j. polskim i angielskim oraz Załączniki zawierające, m. in. dokumentację Uchwał zgody Komisji Bioetycznej na prowadzone badania z udziałem pacjentów i zdrowych uczestników, wzór kwestionariusza KomPAN i ankiet dla pacjentów, czy surowe dane izolatów DNA i wyniki analiz statystycznych. Dołączony do dysertacji opis aktywności naukowej Doktorantki przybliżył jej wizerunek jako już doświadczonego badacza. Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane ze środków pozyskanych przez panią mgr Paulinę Pacynę, kierownika projektu, z Narodowego Centrum Nauki z projektu PRELUDIUM (Grant Nr: UMO-2016/21/N/NZ5/01423. Opiekunem projektu była Pani promotor, prof. Marzena Gajęcka.

Ocena merytoryczna rozprawy

Zainteresowanie badaczy oraz liczba publikacji naukowych dotyczących struktury oraz roli mikrobioty jelitowej w kształtowaniu zdrowia człowieka, a także występowania dysbiozy jelitowej w rozmaitych jednostkach chorobowych w ostatnich latach nabrały bardzo szybkiego tempa i rozmiarów. Obecnie wiadomo, że mikrobiota jelitowa nie uczestniczy wyłącznie w procesach związanych z trawieniem i wchłanianiem substancji pokarmowych, lecz prawidłowa struktura ilościowa i jakościowa mikrobioty (określana jako stan eubiozy) wspiera homeostazę całego organizmu, kształtując odporność, metabolizm i syntezę wielu związków chemicznych, aktywnych biologicznie. Skład mikrobioty jelitowej jest wysoce podatny na zmiany pod wpływem różnych czynników przede wszystkim środowiskowych, takich jak dieta, stosowanie leków, w tym antybiotyków, stosowanie probiotyków, jak również czynników demograficznych oraz genetycznych. Wielu badaczy nie może oprzeć się wrażeniu, że wiele nieodkrytych, niewyjaśnionych mechanizmów patogenezы chorób z natury nieinfekcyjnych jest ściśle związana ze zmianami w strukturze jakościowej i ilościowej mikrobioty człowieka ze szczególnym wskazaniem na mikrobiotę jelit. Przełom w badaniach nad mikrobiomem człowieka pojawił się wraz z wdrożeniem technik sekwencjonowania kwasów nukleinowych nowej generacji, dzięki którym zdobyliśmy możliwość kompleksowego identyfikowania wszystkich mikroorganizmów występujących w heterogennych próbkach zarówno tych drobnoustrojów hodowlanych jak i tych, których nie potrafimy hodować z użyciem znanych technik mikrobiologii tradycyjnej. Dlatego tematyka rozprawy doktorskiej pani mgr Pauliny Pecyny wpisuje się w ten ogólnoświatowy trend naukowy. Przedstawiona praca w bardzo wyraźny sposób pokazuje zarówno możliwości, korzyści stosowanej metody, ale również i trudności i pułapki, które pojawiają się w analizie oraz interpretacji wyników dotyczących znaczenia tego wciąż nie do końca zrozumiałego, ale fascynującego "organu" ludzkiego ciała.

Biorąc pod uwagę ogrom danych pojawiających się w dostępnych bazach na temat mikrobioty jelit godna podkreślenia jest umiejętność Autorki wyboru do Wstępu pracy informacji łączących się ściśle z zadaniem i w sposób płynny i lekki wprowadzanie czytelnika od ogólnych do szczegółowych zagadnień dotyczących bezpośrednio składu i roli mikrobioty jelit, w tym jej wpływu na funkcjonowanie układu immunologicznego. Autorka

również przybliży czytelnikowi metodę genetyczną wykorzystaną w analizie mikrobioty pochodzącej z próbek klinicznych. Wśród technicznych opisów związanych z zaletami i wadami analizowanych fragmentów DNA oraz sposobów interpretacji uzyskanych danych brakuje mi opisu samej techniki sekwencjonowania nowej generacji zastosowanej w urządzeniach firmy Illumina. W następnym podrozdziale krótko została opisana jednostka chorobowa, której poświęcona jest uwaga Doktorantki. W ogólnej ocenie Wstęp jest napisany w sposób przejrzysty i poprawnym językiem. Prezentowana jest aktualna wiedza zgodnie z wytyczonym celem pracy, która jest potwierdzona właściwym cytowaniem piśmiennictwa.

Głównym kierunkiem zawartych w pracy doktorskiej zainteresowań badawczych Pani mgr Pauliny Pecyny była identyfikacja i analiza bakteryjnej struktury mikrobiomu jelit pacjentów z zespołem jelita drażliwego i porównanie z takimi samymi wynikami uzyskanymi dla osób bez dolegliwości żołądkowo-jelitowych. Ciekawym pomysłem było dołączenie do badań analizy wpływu spożywanych produktów mlecznych na mikrobiom jelitowy na podstawie danych uzyskanych z ankiet wypełnionych przez pacjentów.

Pośrednim celem pracy była analiza różnic w składzie mikrobioty jelit u pacjentów ze względu na typ jednostki chorobowej oraz z uwagi na płeć w grupie pacjentów i grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę podkreślany wpływ wieku na skład mikrobioty człowieka oraz dość duży zakres wieku pacjentów włączonych do badań - 18-70 roku życia, zastanawia mnie dlaczego ten czynnik nie został włączony do analiz. Wszystkie badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Świadomą zgodę uzyskano od wszystkich uczestników objętych badaniami.

Założone cele Doktorantka realizowała etapowo stosując zaawansowane metody genetyczne. Metoda sekwencjonowania nowej generacji umożliwiła przeprowadzenie dokładnych badań złożonych społeczności mikroorganizmów występujących w próbkach i analizę wyników na różnych poziomach taksonomicznych. Należy podkreślić, że mimo faktu, że badania z użyciem NGS były wykonane we współpracy naukowej w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach realizacji projektu PRELUDIUM, Doktorantka w sposób precyzyjny i jasny przedstawiła wszystkie metody badawcze, które zostały dobrze wyjaśnione w sposób przystępny i logiczny wskazując na wystarczającą wiedzę do osiągnięcia celów badawczych. Wszystkie analizy bioinformatyczne zostały przeprowadzone prawidłowo z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi. Dużym wyzwaniem jakim postawiła sobie Doktorantka było przeprowadzenie szeregu analiz porównawczych częstości występowania wariantów sekwencji ampikonów zidentyfikowanych na różnych poziomach taksonomicznych.

Wszystkie wyniki poddano również analizie statystycznej, polegającej w większości eksperymentów na ustalaniu relacji między zmiennymi przy pomocy testów nieparametrycznych ANOVA rang Kruskala-Wallisa oraz testów post-hoc. Analizę danych

uzyskanych z ankiet przeprowadzono z użyciem odpowiednich narzędzi eksploracyjnej analizy danych.

Wyniki rozprawy zostały zaprezentowane w przejrzystej analizie wyników badań mikrobioty na siedmiu poziomach taksonomicznych, przedstawionych w dokumentacji tabelarycznej i na wykresach, co pozwoliło na stopniowe zwiększanie zróżnicowania identyfikowanych wariantów amplikonów. Jednocześnie na wszystkich poziomach przeprowadzona została statystyczna analiza porównawcza dla grup IBS i kontrolnej, jak również z podziałem ze względu na płeć. Znowu pojawia się pytanie dlaczego nie włączono analizy dla różnych grup wiekowych. Dołączenie badań ankietowych związanych z dietą mleczną u badanych uczestników zdecydowanie zwiększa wartość poznawczą prowadzonych badań.

Dyskusja rozprawy przedstawia Autorkę jako dojrzałego naukowca, który umiejętnie dyskutuje własne uzyskane wyniki z danymi prezentowanymi przez innych autorów. Doktorantka potrafi krytycznie i odważnie skonfrontować własną interpretację z często odmiennymi wynikami innych badań. Dobór prac poddanych dyskusji jest dokonany w przemyślany i trafny sposób. Doktorantka zdaje sobie sprawę z zalet, ale również i ograniczeń zastosowanych metod badawczych, co wyraziła w podsumowaniu stwierdzając, że uzyskane wyniki mogą jedynie "wskazać kierunek badań mikrobioty jelit, w poszukiwaniu bardziej szczegółowych informacji".

Rozprawa doktorska jest zakończona czterema bardzo wyważonymi wnioskami. Autorka zwraca uwagę na najważniejsze wyniki uzyskane w pracy. Podkreśla ona występowanie różnic w strukturze bakteryjnego mikrobiomu jelit u pacjentów z IBS w porównaniu do grupy kontrolnej, wskazując na większe zróżnicowanie w grupie chorych. Przedstawione wyniki również potwierdziły fakt większego zróżnicowania mikrobioty u kobiet w porównaniu do mężczyzn.

Badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i systematycznie zrealizowała, a uzyskane wyniki omówione są w sposób prawidłowy. Piśmiennictwo jest dobrane odpowiednio, w przeważającej części pochodzące z ostatnich lat. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w dyskusji, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu.

Całościowa ocena wartości naukowej i wnioski końcowe recenzji

Pragnę podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest bardzo wysoka. Pani mgr Paulina Pecyna skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazała pełne zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafi

merytorycznie zinterpretować uzyskane wyniki, podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów. Uważam, że końcowe wnioski w pełni wypływają z otrzymanych wyników i analiz tworząc powiązaną i logiczną całość. Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym, wpisujące się w ogólnoswiatową potrzebę kontynuacji badań nad znaczeniem mikrobioty nie tylko w utrzymaniu homeostazy w organizmie człowieka, ale również jako możliwego czynnika wskazującego lub/i wpływającego na rozwój chorób, także tych nieinfekcyjnych. Pozwala to na stwierdzenie, że oceniana rozprawa stanowi niemały wkład do rozwoju badań w zakresie poszukiwania powiązania struktury mikrobioty z rozwojem zespołu jelita drażliwego.

Wnioski końcowe

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję do Kanclerza Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Pauliny Pecyny do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto w osobnym wniosku postuluję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

dr hab. n. farm. Izabela Korona-Główniak
profesor UM
Izabela Korona-Główniak
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie