Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy

ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Warszawa, 26.07.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Analiza mikrobiomu jelitowego chorych na zaawansowanego czerniaka poddanych immunoterapii"

Autor: mgr inż. Bernadeta Drymel

Promotor: dr hab. n. med. Marcin Schmidt, prof. UPP

Promotor pomocniczy: dr n. med. Łukasz Galus

Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (2026)

Recenzowana rozprawa doktorska została przedstawiona w formie spójnego tematycznie cyklu czterech publikacji, opatrzonego zwartym komentarzem autorki. Forma ta jest w pełni zasadna w świetle art. 187 ust. 3 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Publikowanie pozwala na wcześniejsze udostępnienie wyników społeczności naukowej i zwiększa ich weryfikowalność. Cykl obejmuje jeden przegląd literatury (Publikacja 2., 2020) oraz trzy oryginalne prace badawcze (Publikacje 1., 3., 4.). Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich czterech publikacji cyklu. Łączna punktacja MNiSW cyklu wynosi 560 pkt, a sumaryczny Impact Factor osiąga 20,924 — są to wartości znacząco przekraczające wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie nauki medyczne.

Główną hipotezą badawczą rozprawy jest założenie, że skład mikrobioty jelitowej (bakterie i archeony), jej frakcji związanej z immunoglobulinami (Ig-frakcja), pozakomórkowego bakteryjnego DNA (cfmDNA) krążącego w osoczu krwi oraz stan bariery jelitowej pozostają w związku z odpowiedzią na immunoterapię anty-PD-1 oraz z czasem wolnym od progresji (PFS) i czasem przeżycia całkowitego (OS) chorych na zaawansowanego czerniaka. Uzupełniające założenie zakłada, że wymienione parametry zmieniają się w trakcie leczenia. Tak sformułowana hipoteza jest aktualna klinicznie i naukowo, a jej weryfikacja w populacji polskiej — dotychczas nieobjętej podobnymi analizami — ma istotne znaczenie translacyjne,

biorąc pod uwagę wykazane w literaturze różnice populacyjne w związkach mikrobioty jelitowej z efektem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (ICI).

Praca została osadzona w bardzo aktualnym paradygmacie badań nad interakcjami mikrobiota–gospodarz–nowotwór oraz nad markerami odpowiedzi na immunoterapię. Doktorantka konsekwentnie realizuje badania na trzech uzupełniających się poziomach: (i) mikrobioty jelitowej i jej Ig-frakcji, (ii) biomarkerów stanu bariery jelitowej (zonulina, kalprotektyna, wydzielnicze IgA — SIgA) oraz (iii) krążącego cfmDNA i rozpuszczalnego CD14 (sCD14) w osoczu. Takie zintegrowane, wielopoziomowe podejście stanowi wyraźną wartość dodaną w stosunku do dotychczasowej literatury i uzasadnia twierdzenie, że praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Cele badawcze zostały jasno sformułowane w rozdziale „Założenia rozprawy doktorskiej" i konsekwentnie rozwinięte w celach szczegółowych każdej z publikacji. Doktorantka zdefiniowała je jako: (1) analizę związku pomiędzy składem mikrobioty jelitowej, Ig-frakcji, krążącego cfmDNA i stanem bariery jelitowej a odpowiedzią na immunoterapię anty-PD-1 oraz PFS i OS, oraz (2) obserwację zmian wymienionych parametrów w trakcie leczenia. Cele te są jednoznacznie powiązane z hipotezami, a każda z publikacji cyklu realizuje wyodrębniony ich fragment: charakterystykę mikrobioty jelitowej w punkcie T0 (Publikacja 1.), teoretyczne podłoże roli SIgA w barierze jelitowej (Publikacja 2.), ocenę biomarkerów bariery jelitowej i Ig-frakcji mikrobioty w dynamice leczenia (Publikacja 3.) oraz analizę krążącego cfmDNA i sCD14 w osoczu (Publikacja 4.).

Badanie zaprojektowano prospektywnie, prowadząc rekrutację w latach 2018–2021 w Oddziale Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Poznaniu. Objęło ono 66 chorych na zaawansowanego czerniaka kwalifikowanych do immunoterapii anty-PD-1 oraz 10 zdrowych ochotników. Klasyfikację odpowiedzi na leczenie (R/NR oraz CB/NB) oparto na najlepszej uzyskanej odpowiedzi klinicznej, a próbki kału i krwi pobierano w zdefiniowanych punktach czasowych (T0 — przed leczeniem, T1 — po ok. 3 miesiącach, Tn — po 6–12 miesiącach). Doktorantka rzetelnie przedstawia charakterystykę demograficzną i kliniczną grup: brak istotnych różnic w wieku, płci, stadium zaawansowania, mutacjach BRAF V600E/V600K i parametrach morfologii krwi pomiędzy R i NR oraz CB i NB, przy wyższej medianie stężenia LDH w grupach NR i NB — obserwacja zgodna z ugruntowaną wiedzą o wartości prognostycznej tego markera w czerniaku. Na wysoką ocenę zasługuje autokrytyczne omówienie ograniczeń grupy kontrolnej (mała liczebność, młodszy

wiek) oraz świadoma, uzasadniona decyzja o rezygnacji z publikowania jej wyników w artykułach 3. i 4. cyklu — jest to przykład rzetelności metodologicznej.

Zastosowany zestaw metod jest nowoczesny, komplementarny i adekwatny do postawionych celów. Obejmuje on sekwencjonowanie regionów hiperzmiennych V3–V4 genu kodującego 16S rRNA, pełnogenomowe sekwencjonowanie typu shotgun, sekwencjonowanie krążącego cfmDNA z osocza, immunoenzymatyczne oznaczenia biomarkerów bariery jelitowej i sCD14 w testach ELISA, jak również analizy bioinformatyczne różnorodności alfa- i beta- oraz statystyczne modele przeżycia. Osobno należy podkreślić istotny udział Doktorantki w opracowaniu i zastosowaniu protokołu izolacji Ig-frakcji mikrobioty jelitowej oraz przeprowadzeniu jej sekwencjonowania u chorych na zaawansowanego czerniaka poddawanych immunoterapii anty-PD-1 — według wiedzy recenzenta jest to pierwsza tego typu analiza w tej grupie chorych.

Wyniki odpowiadają postawionym celom pracy. Publikacja 1. (Pietrzak i wsp., Cancers 2022) po raz pierwszy dokumentuje charakterystykę mikrobioty jelitowej chorych na zaawansowanego czerniaka w populacji polskiej i pokazuje jej związek z odpowiedzią na immunoterapię anty-PD-1. Wzbogacenie mikrobioty grupy R w *Prevotella copri* i *Bacteroides uniformis*, przy wzbogaceniu grupy NR w *Faecalibacterium prausnitzii* i *Desulfovibrio intestinalis*, jest zestawione ze sprzecznymi doniesieniami z innych populacji, a interpretacja rozbieżności odwołuje się do heterogeniczności kladów *Prevotella copri* oraz różnorodności filogenetycznej *Faecalibacterium prausnitzii*. Doktorantka wykazała ponadto związek nawyków żywieniowych (spożycie warzyw, owoców, mleka i przetworów mlecznych, typu tłuszczu), częstotliwości oddawania stolca oraz grupy krwi Rh z odpowiedzią na leczenie. Wyniki te dostarczają unikalnych danych populacyjnych i stanowią silny argument za koniecznością spersonalizowanego, uwzględniającego różnice populacyjne, podejścia do modulacji mikrobioty w onkologii.

Publikacja 2. (Pietrzak i wsp., IJMS 2020) jest starannie skonstruowanym przeglądem literatury dotyczącym budowy, syntezy, regulacji oraz funkcji SIgA w jelitach, stanowiącym niezbędne zaplecze teoretyczne dla dalszych badań eksperymentalnych. Praca — cytowana już 194 razy — pełni rolę porządkującą stan wiedzy i uzasadnia wybór SIgA jako jednego z kluczowych biomarkerów badanych w cyklu.

Publikacja 3. (Drymel i wsp., IJMS 2025) łączy dwa wątki: charakterystykę stanu bariery jelitowej oraz Ig-frakcji mikrobioty. Doktorantka wykazała wyższe stężenie SIgA w kale u

chorych R (odpowiadających na immunoterapię anty-PD-1) i CB (chorych, którzy uzyskali korzyść kliniczną z immunoterapii anty-PD-1) w porównaniu z NR i NB, brak istotnych statystycznie różnic w stężeniu zonuliny i kalprotektyny pomiędzy grupami, a jednocześnie związek wszystkich trzech biomarkerów z PFS i/lub OS. Szczególnie cenna jest obserwacja, że wysokie stężenie SIgA (>819,5 µg/mL dla PFS; >5477,0 µg/mL dla OS) i wysokie stężenie zonuliny (>303,4 ng/mL) wiązały się z dłuższym przeżyciem. Wysokie stężenie kalprotektyny (>211,9 µg/mL) wiązało się z krótszym PFS, natomiast dla OS stwierdzono zależność graniczną (HR 2,6; 95% CI 0,98–7,1; p = 0,054). Wyniki te otwierają nowe kierunki interpretacyjne — Doktorantka wysuwa hipotezę, że zwiększona przepuszczalność bariery jelitowej i związana z nią translokacja mikroorganizmów lub ich metabolitów mogły w określonych warunkach sprzyjać aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej, m.in. poprzez mimikrę molekularną i indukcję SIgA, co harmonizuje z doniesieniami o roli krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Analiza Ig-frakcji ujawniła ponadto zmiany w jej składzie w trakcie leczenia, liczniejsze w grupach NR i NB niż R i CB, oraz szereg przeciwstawnych korelacji między względnym udziałem *Akkermansia muciniphila*, *F. prausnitzii*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* w mikrobiocie i jej Ig-frakcji — obserwacje te są nowatorskie i klinicznie interesujące.

Tabela 1. Zbiorcze zestawienie wyznaczonych w rozprawie punktów odcięcia biomarkerów oraz odpowiadających im wartości ilorazu ryzyka (HR) z 95% przedziałem ufności (CI) i p (regresja proporcjonalnego hazardu Coxa; opracowanie własne recenzenta na podstawie danych z Publikacji 3. — Drymel i wsp., IJMS 2025 oraz Publikacji 4. — Drymel i wsp., IJMS 2024).

Biomarker	Materiał / punkt czasowy	Punkt odcięcia	Punkt końcowy	HR (95% CI)	p
Zonulina (kał)	T0	> 303 ng/mL	OS	0,29 (0,099–0,83)	0,021
SIgA (kał)	T0	> 820 µg/mL	PFS	0,34 (0,14–0,85)	0,021
SIgA (kał)	T0	> 5477 µg/mL	OS	0,27 (0,093–0,78)	0,015
Kalprotektyna (kał)	T0	> 212 µg/mL	PFS	2,5 (1,0–6,0)	0,042
Kalprotektyna (kał)	T0	> 212 µg/mL	OS	2,6 (0,98–7,1)	0,054
sCD14 (osocze)	T0	> 1992,5 ng/mL	PFS	2,1 (1,1–4,0)	0,026

Biomarker	Materiał / punkt czasowy	Punkt odcięcia	Punkt końcowy	HR (95% CI)	p
sCD14 (osocze)	T0	> 4187,5 ng/mL	OS	3,7 (1,4–9,9)	0,010
sCD14 – wzrost/stabilność	T1 vs. T0	↑ lub =	PFS	2,4 (1,1–5,3)	0,033
sCD14 – wzrost/stabilność	T1 vs. T0	↑ lub =	OS	7,0 (0,91–53)	0,061

Zestawienie w Tabeli 1. ilustruje dwukierunkowy wzorzec związków biomarkerów z rokowaniem. Wyższe stężenia SIgA oraz zonuliny, traktowanej w badaniu jako pośredni marker przepuszczalności bariery jelitowej, były związane z lepszym rokowaniem (HR < 1). Wyższe stężenia kalprotektyny i sCD14 — markera aktywacji odporności wrodzonej, potencjalnie związanej z układową ekspozycją na komponenty mikroorganizmów — były związane z gorszym rokowaniem (HR > 1), przy czym dla kalprotektyny w odniesieniu do OS zależność miała charakter graniczny. Wzrost lub stabilność stężenia sCD14 w punkcie T1 względem T0 wiązały się z większym ryzykiem progresji (PFS HR = 2,4; 95% CI 1,1–5,3; p = 0,033). Dla OS obserwowano eksploracyjny trend w kierunku większego ryzyka zgonu, obarczony znaczną nieprecyzyjnością oszacowania (OS HR = 7,0; 95% CI 0,91–53; p = 0,061), wymagający walidacji w większej kohorcie.

Publikacja 4. (Drymel i wsp., IJMS 2024) obejmuje jako pierwsza w tej grupie chorych łączną analizę krążącego cfmDNA i sCD14 w osoczu w dynamice leczenia. Doktorantka opisała dominację DNA typu *Pseudomonadota* oraz wyższą różnorodność cfmDNA w grupach NR i NB w punkcie T1. Wykazała także związek bazowego udziału wybranych taksonów z przeżyciem, m.in. rodzajów *Acinetobacter* i *Kocuria* z PFS i OS, taksonu z rodziny *Xanthobacteraceae* oraz rodzajów *Blautia* i *Diaphorobacter* z PFS, a także szeregu innych rodzajów z OS. Kluczowa jest obserwacja, że stężenie sCD14 >1992,5 ng/mL dla PFS i >4187,5 ng/mL dla OS przed leczeniem wiązało się z gorszym rokowaniem. Wzrost lub stabilność stężenia sCD14 w punkcie T1 względem T0 również wiązały się z gorszymi wynikami klinicznymi, przy czym związek z OS miał charakter eksploracyjny i wymaga potwierdzenia. Zestawienie tych danych z opisanymi w literaturze wzorcami mikrobioty guza sugeruje, że rezerwuarem cfmDNA mogą być drobnoustroje mikrośrodowiska nowotworu — hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji.

Zestawiając wyniki cyklu można stwierdzić, że rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w rozumieniu art. 187 ust. 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1571, tekst jednolity):

– jest pierwszą kompleksową analizą związku mikrobioty jelitowej i jej Ig-frakcji z odpowiedzią na immunoterapię anty-PD-1 u chorych na zaawansowanego czerniaka w populacji polskiej;

– wprowadza łączną, dynamiczną (w punktach T0, T1, Tn) analizę biomarkerów stanu bariery jelitowej (zonulina, kalprotektyna, SIgA) i mikrobioty jelitowej u pacjentów onkologicznych;

– jako pierwsza charakteryzuje Ig-frakcję mikrobioty jelitowej w tej grupie chorych;

– dostarcza nowych danych o wartości prognostycznej krążącego cfmDNA i sCD14 w osoczu u chorych na zaawansowanego czerniaka leczonych anty-PD-1;

– identyfikuje niedoceniane wcześniej korelaty odpowiedzi klinicznej: nawyki żywieniowe, częstotliwość wypróżnień oraz grupę krwi Rh.

Rozprawa jednoznacznie wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę. Świadczą o tym: pierwsze autorstwo wszystkich czterech publikacji cyklu, w tym wszystkich trzech prac oryginalnych, istotny udział w projektowaniu metod, wykonaniu badań, zbieraniu i analizie — w tym statystycznej — danych, interpretacji wyników, wizualizacji oraz przygotowaniu pierwszych wersji manuskryptów, a także krytyczne, autorskie omówienie ograniczeń badań — m.in. niewielkiej liczebności grupy kontrolnej, heterogeniczności szczepowej w obrębie *P. copri* i *F. prausnitzii*, ograniczonej rozdzielczości sekwencjonowania regionów V3–V4 dla identyfikacji na poziomie gatunku oraz konieczności ustalenia populacyjnie specyficznych wartości referencyjnych biomarkerów bariery jelitowej. Dorobek naukowy Doktorantki (11 artykułów, łączna punktacja MNiSW = 1420, sumaryczny IF = 53,479, 6 prac jako pierwsza i korespondencyjna autorka, staż w Wageningen University & Research, stypendia rektorskie i doktoranckie NCN) istotnie przewyższa wymagania stawiane doktorantom.

Rozprawa jednoznacznie prezentuje również ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne. Doktorantka biegle porusza się w problematyce immunologii śluzówkowej, biologii mikrobiomu, biomarkerów stanu bariery jelitowej i immunoterapii onkologicznej. Bibliografia komentarza obejmuje aktualne, prestiżowe źródła (Nat Med, Nature, Science, Cell, JAMA Dermatol, JITC, Nat Rev Gastroenterol Hepatol) i jest krytycznie

zintegrowana z uzyskanymi wynikami. Rozdział „Omówienie każdej pracy…" jest wzorcowo skonstruowany: każda publikacja jest przedstawiona w kontekście aktualnego stanu wiedzy, z jasnym wskazaniem rozbieżności z innymi badaniami i propozycją ich wyjaśnienia.

Mocne strony rozprawy to: (a) interdyscyplinarność — praca łączy immunologię śluzówkową, mikrobiologię, biologię molekularną, bioinformatykę i onkologię kliniczną; (b) wielopoziomowa integracja danych (mikrobiota jelitowa, Ig-frakcja, biomarkery bariery jelitowej, krążący cfmDNA, sCD14, dane kliniczne i ankietowe); (c) spójny projekt podłużny obejmujący trzy punkty czasowe leczenia, co umożliwia analizę dynamiki markerów; (d) pionierski charakter badania w populacji polskiej i pierwsza w tej grupie chorych charakterystyka Ig-frakcji mikrobioty jelitowej; (e) wysokiej jakości warsztat metodologiczny (sekwencjonowanie 16S rRNA V3–V4 i shotgun, ELISA, analizy różnorodności, testy przeżycia); (f) krytyczna, przejrzysta interpretacja wyników z jawnym omówieniem ograniczeń i rozbieżności z literaturą; (g) translacyjny potencjał wyników — sugestie modyfikacji dietetycznych oraz ukierunkowanej modulacji bariery jelitowej i mikrobioty jako strategii poprawy skuteczności immunoterapii; (h) imponujący dorobek publikacyjny Doktorantki oraz forma cyklu publikacji (art. 187 ust. 3 ustawy), która przyspieszyła upowszechnienie wyników.

Uwagi o charakterze redakcyjnym i dyskusyjnym — nie obniżające wartości naukowej rozprawy — obejmują: (i) w komentarzu warto byłoby zamieścić zbiorczą tabelę zestawiającą wszystkie wyznaczone punkty odcięcia biomarkerów (SIgA, zonulina, kalprotektyna, sCD14) wraz z ich wartościami HR i 95% CI dla PFS i OS — takie zestawienie ułatwiałoby czytelnikowi odbiór wyników i porównanie z danymi literaturowymi; (ii) w kontekście heterogeniczności kladów *P. copri* zasadne byłoby wskazanie w dyskusji, czy planowana jest walidacja wyników w większej grupie pacjentów, umożliwiająca różnicowanie na poziomie szczepu; (iii) analiza wpływu profilu antybiotykoterapii, inhibitorów pompy protonowej i probiotyków przed T0 oraz w trakcie leczenia (znanych czynników modulujących mikrobiotę) mogłaby wzmocnić interpretację obserwowanych zmian dynamicznych; (iv) warto rozważyć w dalszych badaniach uzupełnienie danych o profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w osoczu i kale — jako łącznik między mikrobiotą, barierą jelitową a odpowiedzią immunologiczną. Uwagi te mają charakter dyskusyjny i wskazują naturalne, następcze kierunki badań, wpisujące się w rozwój prowadzonej przez Doktorantkę linii badawczej.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Bernadety Drymel pt. „Analiza mikrobiomu jelitowego chorych na zaawansowanego czerniaka poddanych immunoterapii" spełnia wszystkie wymogi ustawowe określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm.): (1) prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne, (2) wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz (3) stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiona forma cyklu publikacji jest w pełni zgodna z art. 187 ust. 3 ustawy.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie kryteria właściwe dla rozpraw doktorskich, co uzasadnia postawienie wniosku o **przyjęcie rozprawy doktorskiej, dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora**. Zwracam się do Kapituły Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o podjęcie stosownych uchwał w tym zakresie.

Z uwagi na fakt, iż rozprawa mgr inż. Bernadety Drymel w pełni spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim, a wręcz je istotnie przewyższa — jest oryginalna, metodycznie rzetelna, ma pionierski charakter w populacji polskiej, opiera się na bogatym, wielopoziomowym materiale badawczym, a jej wyniki mają wyraźny potencjał translacyjny i zostały już opublikowane w czterech artykułach w renomowanych czasopismach (łączny IF = 20,924, MNiSW = 560 pkt) — z pełnym przekonaniem rekomenduję przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, z ***wyróżnieniem*** ze względu na wysoką jakość wykonania, pionierski charakter w populacji polskiej oraz imponujący dorobek publikacyjny Doktorantki.

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Anna M. Czarnecka, MBA
lekarka specjalistka onkologii klinicznej
PWZ: 3456592

Prof. Anna M. Czarnecka, MD, PhD, MBA
Kierownik Oddziału Chemioterapii Dziennej
Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
— Państwowy Instytut Badawczy
ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa
Tel.: +48 22 546 29 49
E-mail: am.czarnecka@pib-nio.pl