Dolnośląskie Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii

DCOPiH

Wydział Medyczny Politechniki Wrocławskiej

Politechnika Wrocławska

Wydział Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.

„Analiza mikrobiomu jelitowego chorych na zaawansowanego czerniaka poddanych immunoterapii"

mgr inż. Bernadety Drymel

(publikującej w dwóch pierwszych pracach cyklu pod nazwiskiem Bernadeta Pietrzak)

przygotowanej pod kierunkiem

dr. hab. n. med. Marcina Schmidta, prof. UPP – promotora

oraz

dr. n. med. Łukasza Galusa – promotora pomocniczego

Podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących związku mikrobioty jelitowej, funkcjonowania bariery jelitowej oraz krążących biomarkerów pochodzenia mikrobiologicznego z wynikami immunoterapii anty-PD-1 u chorych na zaawansowanego czerniaka ma dużą wartość poznawczą i potencjalnie kliniczną. Inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych istotnie poprawiły rokowanie tej grupy chorych, jednak odpowiedź na leczenie pozostaje niejednorodna, a wiarygodne biomarkery pozwalające przewidywać przebieg terapii są nadal poszukiwane.

Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny i łączy onkologię kliniczną, mikrobiologię, immunologię, biologię molekularną, bioinformatykę oraz analizę statystyczną. Szczególnie interesujące jest równoległe badanie składu mikrobioty kału, frakcji mikroorganizmów związanych z immunoglobulinami, markerów bariery jelitowej, krążącego pozakomórkowego DNA bakteryjnego oraz rozpuszczalnego CD14. Tak szerokie ujęcie problemu stanowi niewątpliwą zaletę pracy, chociaż jednocześnie zwiększa ryzyko analiz wielokrotnych i wymaga ostrożnego formułowania wniosków.

Przedstawiona rozprawa liczy 164 strony i obejmuje komentarz do cyklu, streszczenie w języku polskim i angielskim, kopie czterech publikacji, oświadczenia współautorów oraz orzeczenia Komisji Bioetycznej. W dwóch pierwszych publikacjach Doktorantka występuje pod nazwiskiem Bernadeta Pietrzak, a w dwóch kolejnych jako Bernadeta Drymel. Dla pełnej przejrzystości informacja o zmianie nazwiska powinna być jednoznacznie zaznaczona również w części formalnej rozprawy.

Rozprawę stanowi cykl czterech powiązanych tematycznie publikacji, w tym trzech prac oryginalnych i jednej pracy przeglądowej:

1. Pietrzak B. i wsp. A Clinical Outcome of the Anti-PD-1 Therapy of Melanoma in Polish Patients Is Mediated by Population-Specific Gut Microbiome Composition. Cancers. 2022;14:5369. IF 5,200; 140 punktów MNiSW.
2. Pietrzak B. i wsp. Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21:9254. IF 5,924; 140 punktów MNiSW.
3. Drymel B. i wsp. Characteristics of Intestinal Barrier State and Immunoglobulin-Bound Fraction of Stool Microbiota in Advanced Melanoma Patients Undergoing Anti-PD-1 Therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2025;26:8063. IF 4,900; 140 punktów MNiSW.

4. Drymel B. i wsp. Circulating Cell-Free Microbial DNA Signatures and Plasma Soluble CD14 Level Are Associated with Clinical Outcomes of Anti-PD-1 Therapy in Advanced Melanoma Patients. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25:12982. IF 4,900; 140 punktów MNiSW.

Łączna punktacja ministerialna prac tworzących cykl wynosi 560 punktów, a sumaryczny współczynnik Impact Factor 20,924. Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich publikacji. Jej cały dorobek obejmuje 11 artykułów naukowych o deklarowanej łącznej punktacji 1420 punktów i sumarycznym IF 53,479 oraz jedną monografię. W sześciu publikacjach jest pierwszą i korespondencyjną autorką. Dorobek ten należy ocenić bardzo wysoko.
Zgodnie z deklaracjami zamieszczonymi w artykułach Doktorantka uczestniczyła w opracowaniu metod, analizie danych, w tym analizie statystycznej, prowadzeniu badań, gromadzeniu i porządkowaniu danych, przygotowaniu manuskryptów oraz wizualizacji wyników. Koncepcja projektu, nadzór, zarządzanie projektem i pozyskanie finansowania pozostawały głównie po stronie promotora i pozostałych współautorów. Nie umniejsza to istotnego wkładu Doktorantki, lecz podkreśla zespołowy charakter przeprowadzonych badań. Nie pomniejsza to w żadnym względzie istotnego wkładu Doktorantki, ale pokazuje zespołowy charakter badań.

Doktorantka przyjęła dwa zasadnicze założenia: po pierwsze, istnienie związku pomiędzy badanymi parametrami a odpowiedzią na immunoterapię, PFS i OS, a po drugie, występowanie zmian tych parametrów w trakcie leczenia anty-PD-1. Założenia są logiczne i wynikają z aktualnego stanu wiedzy, mają szeroki, głównie eksploracyjny charakter.
W zależności od publikacji analizą objęto 64 lub 66 chorych na nieresekcyjnego czerniaka skóry w stopniu III lub IV, leczonych niwolumabem lub pembrolizumabem w jednym ośrodku w latach 2018–2021. Odpowiedź oceniano według RECIST 1.1. Stosowano dwie klasyfikacje: R versus NR, w której stabilizację choroby zaliczono do braku odpowiedzi, oraz CB versus NB, w której stabilizacja stanowiła korzyść kliniczną. Drugie ujęcie częściowo kompensuje ograniczenia pierwszego, jednak bardziej klinicznie użyteczna byłaby definicja trwałej korzyści klinicznej z określonym minimalnym czasem trwania kontroli choroby.
Pełne publikacje pokazują, że zakres kontroli potencjalnych czynników zakłócających był szerszy, niż wynikało ze streszczenia. W pierwszej pracy zebrano dane o antybiotykach, inhibitorach pompy protonowej, lekach zobojętniających, NLPZ, kwasie acetylosalicylowym, probiotykach, diecie, paleniu tytoniu i spożyciu alkoholu. Grupa kontrolna składała się z

bliskich krewnych chorych, mieszkających z nimi w tym samym gospodarstwie domowym, co pozwalało częściowo ograniczyć wpływ czynników środowiskowych. Jej istotnym ograniczeniem była jednak niewielka liczebność oraz młodszy wiek uczestników w porównaniu z grupą chorych.

Najważniejszym klinicznym czynnikiem zakłócającym pozostaje stężenie LDH. Mediana stężenia LDH była istotnie wyższa u chorych z niekorzystnymi wynikami leczenia. Ponadto odsetek chorych z podwyższonym stężeniem LDH był istotnie wyższy w grupie NB niż w grupie CB. W żadnej z prac nie przedstawiono modeli wieloczynnikowych uwzględniających stężenie LDH, kategorię M, w tym obecność przerzutów do ośrodkowego układu nerwowego (M1d), stan sprawności, linię leczenia oraz wcześniejsze leczenie. Ogranicza to możliwość stwierdzenia, że badane parametry mają niezależną wartość rokowniczą.

Publikacja 1 – mikrobiota wyjściowa i czynniki środowiskowe

Pierwsza praca obejmowała 64 chorych oraz 10 osób zdrowych, przy czym pełne dane ankietowe i próbki kału były dostępne dla 57 pacjentów. Zastosowano sekwencjonowanie regionów V3–V4 genu 16S rRNA, DADA2, bazę SILVA, analizę alfa- i beta-różnorodności oraz PERMANOVA. W analizie różnicowej ASV wykorzystano korektę FDR. Dodatkowo u 16 chorych przeprowadzono sekwencjonowanie shotgun, rekonstrukcję MAG oraz identyfikację kladów Prevotella copri. Za wartościowe należy uznać wykazanie odmienności mikrobioty polskiej kohorty oraz świadome skonfrontowanie wyników z niespójnymi danymi międzynarodowymi. Efekt beta-różnorodności był jednak mały, mimo istotności statystycznej, a wyniki dotyczące Faecalibacterium prausnitzii były przeciwne do wielu wcześniejszych badań. Powinny być interpretowane jako sygnały specyficzne dla kohorty, wymagające zewnętrznej walidacji. Analizy ankietowe obejmowały dużą liczbę zmiennych, a korekty wielokrotnych porównań nie zastosowano konsekwentnie do wszystkich testów. Wyniki dotyczące sposobu żywienia, częstotliwości oddawania stolca, a zwłaszcza czynnika Rh, mogą zatem obejmować obserwacje przypadkowe. Dane dotyczące sposobu żywienia opierały się na deklaracjach uczestników i nie zostały zebrane przy użyciu zwalidowanego kwestionariusza żywieniowego ani ilościowej oceny spożycia. Wniosek, że zmiana diety przed leczeniem mogłaby poprawić jego skuteczność, wykracza poza możliwości badania obserwacyjnego.

Publikacja 2 – przegląd dotyczący wydzielniczej IgA

Praca przeglądowa stanowi obszerne i dobrze udokumentowane wprowadzenie do roli SIgA w obronie śluzówkowej i regulacji relacji gospodarz–mikrobiota. Jest spójna z dalszą częścią cyklu i była szeroko cytowana. Należy jednak pamiętać, że nie zawiera wyników własnych i sama nie weryfikuje założeń rozprawy. Oryginalne rozwiązanie problemu naukowego wynika z trzech publikacji badawczych.

Publikacja 3 – bariera jelitowa i frakcja mikrobioty związana z immunoglobulinami

Trzecia publikacja jest jednym z najciekawszych elementów cyklu. Oceniono 115 próbek metodą ELISA, 108 próbek frakcji Ig-związanej i 117 próbek całkowitej mikrobioty kału, pobranych u 64 chorych w punktach T0, T1 i Tn. Zastosowano ALDEx2 do analizy różnicowej, transformację Hellingera, analizę korelacji oraz modele przeżycia. Wykazano wyższe wyjściowe stężenie SIgA u chorych z korzystnym wynikiem leczenia oraz zależności pomiędzy SIgA, kalprotektyną, zonuliną a PFS i OS. Istotnym ograniczeniem jest jednak brak uwzględnienia stężenia LDH w analizach przeżycia, ponieważ marker ten pozostaje związany z obciążeniem chorobą i rokowaniem chorych na zaawansowanego czerniaka.

Publikacja 4 – krążące cfmDNA i sCD14

Czwarta praca analizuje 73 próbki osocza pod kątem cfmDNA oraz 152 próbki pod kątem sCD14, pochodzące od 66 chorych. Materiał przygotowano z zastosowaniem podwójnego wirowania osocza, aparat do izolacji poddawano dekontaminacji UV, a z danych usunięto 166 ASV należących do rodzajów uznanych na podstawie piśmiennictwa za prawdopodobne kontaminanty. Wykazano różnice w składzie cfmDNA oraz stężeniu sCD14 pomiędzy grupami o odmiennych wynikach leczenia, a także ich związki z PFS i OS. Wyniki te są interesujące, ale ze względu na małą liczbę próbek podłużnych i szczególne ryzyko zanieczyszczenia materiału niskobiomasowego powinny być traktowane jako eksploracyjne. W publikacji nie opisano jednoznacznie równoległych kontroli ujemnych obejmujących cały proces izolacji i amplifikacji DNA, co ogranicza pewność interpretacji części wykrytych sygnałów.

Pomimo dużej wartości naukowej pracy oraz zastosowania nowoczesnych metod badawczych, rozprawa ma kilka istotnych ograniczeń, które należy uwzględnić przy interpretacji wyników.

1. Niejasna liczba chorych i próbek w poszczególnych analizach

W kolejnych publikacjach podawane są różne liczby chorych – 64 lub 66 – oraz różne liczby próbek. Brakuje jednego, czytelnego schematu pokazującego, ilu pacjentów włączono do

badania, ilu dostarczyło materiał przed leczeniem oraz po 3, 6, 9 i 12 miesiącach, a także dlaczego część próbek nie była dostępna. Utrudnia to ocenę kompletności danych i wiarygodności porównań prowadzonych w czasie.

2. Brak uwzględnienia najważniejszych czynników klinicznych

Najistotniejszym ograniczeniem jest brak analiz wieloczynnikowych. W grupach chorych o gorszych wynikach leczenia stwierdzono wyższe stężenie LDH, które samo w sobie jest ważnym czynnikiem rokowniczym w zaawansowanym czerniaku. Nie można więc jednoznacznie rozstrzygnąć, czy obserwowane zależności dotyczące mikrobioty, SIgA, kalprotektyny, zonuliny lub sCD14 mają niezależne znaczenie, czy częściowo wynikają z różnic w zaawansowaniu choroby i ogólnym rokowaniu pacjentów. W analizach należało uwzględnić co najmniej LDH, stopień M, wiek, obecność przerzutów do mózgu, stan sprawności i linię leczenia.

3. Ograniczenia analiz zmian zachodzących podczas leczenia

Punkt Tn obejmował próbki pobierane w różnych terminach – po około 6, 9 lub 12 miesiącach. Są to okresy klinicznie i biologicznie odmienne, dlatego ich łączenie w jedną grupę utrudnia ocenę rzeczywistych zmian zachodzących pod wpływem leczenia.

Ponadto późniejsze próbki mogły zostać pobrane przede wszystkim od pacjentów, którzy dłużej żyli, pozostawali w leczeniu i byli w lepszym stanie ogólnym. Oznacza to, że część obserwowanych różnic może wynikać z selekcji chorych, a nie bezpośrednio z działania immunoterapii. Nie przedstawiono również wystarczająco jasno, czy porównania czasowe wykonywano wyłącznie u tych samych pacjentów posiadających próbki z obu analizowanych punktów.

4. Duża liczba analiz i ryzyko przypadkowych wyników

W rozprawie oceniano bardzo wiele bakterii, biomarkerów, danych klinicznych, parametrów krwi, informacji dietetycznych i zależności pomiędzy nimi. Korektę wielokrotnych porównań zastosowano w części analiz, ale nie we wszystkich.

Wyniki takie mogą wskazywać jedynie na pewien trend i powinny być wyraźnie określane jako eksploracyjne, czyli służące do tworzenia nowych hipotez, a nie jako potwierdzone zależności. Dotyczy to szczególnie obserwacji związanych z czynnikiem Rh, wybranymi składnikami diety, pojedynczymi taksonami bakteryjnymi i częścią analiz cfmDNA.

5. Zbyt daleko idąca interpretacja niektórych zależności

Badanie miało charakter obserwacyjny i wykazywało przede wszystkim związki statystyczne. Nie pozwala ono natomiast udowodnić, że określone bakterie, dieta, zwiększona

przepuszczalność jelita lub zmiany stężenia SIgA bezpośrednio powodowały lepszą albo gorszą odpowiedź na immunoterapię.

Podobnie wykrycie bakteryjnego DNA w osoczu nie dowodzi obecności żywych bakterii ani ich translokacji z jelita lub guza. Sformułowania dotyczące możliwości poprawy wyników leczenia poprzez zmianę diety, modyfikację bariery jelitowej lub wpływ terapii anty-PD-1 na produkcję IgA powinny być przedstawiane jako interesujące hipotezy wymagające dalszych badań.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z pełnymi tekstami publikacji oceniam rozprawę wysoko pod względem warsztatu laboratoryjnego i bioinformatycznego. Na szczególne uznanie zasługują: zastosowanie sekwencjonowania shotgun i rekonstrukcji MAG w części pierwszej pracy, użycie ALDEx2 w analizach kompozycyjnych, prospektywne i wielopunktowe gromadzenie materiału, charakterystyka frakcji mikrobioty związanej z immunoglobulinami oraz podjęcie trudnej metodologicznie analizy cfmDNA. Jednocześnie pełne publikacje potwierdzają, że wyniki mają przede wszystkim charakter eksploracyjny. Ograniczenia te nie podważają wartości poznawczej pracy, ale nie pozwalają traktować opisanych markerów jako zwalidowanych narzędzi klinicznych.

Pytania do Doktorantki

1. Czy zależności pomiędzy badanymi biomarkerami a PFS i OS utrzymują się po uwzględnieniu LDH oraz innych istotnych czynników klinicznych, takich jak stopień zaawansowania, stan sprawności, obecność przerzutów do mózgu i linia leczenia?
2. Ilu pacjentów miało kompletne, sparowane próbki w punktach T0–T1 oraz T0–Tn dla poszczególnych analiz i jakie były główne przyczyny braku kolejnych próbek?
3. Jakie było uzasadnienie połączenia próbek pobranych po około 6, 9 i 12 miesiącach w jeden punkt Tn oraz w jaki sposób mogło to wpłynąć na ocenę zmian zachodzących podczas leczenia?
4. Jakie dokładnie kontrole ujemne zastosowano w analizie cfmDNA i w jaki sposób odróżniano rzeczywisty sygnał biologiczny od możliwego zanieczyszczenia laboratoryjnego?
5. Który z uzyskanych wyników Doktorantka uważa za najbardziej obiecujący i jak zaprojektowałaby badanie walidacyjne, które pozwoliłoby potwierdzić jego niezależną wartość kliniczną?

Rozprawa dokumentuje szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki medyczne oraz jej umiejętność prowadzenia interdyscyplinarnej pracy naukowej. Publikacje tworzą logiczny i spójny cykl, a indywidualny wkład Doktorantki jest znaczący i odpowiednio udokumentowany.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Bernadety Drymel pt. „Analiza mikrobiomu jelitowego chorych na zaawansowanego czerniaka poddanych immunoterapii", przygotowana pod kierunkiem dr. hab. n. med. Marcina Schmidta, prof. UPP, oraz promotora pomocniczego dr. n. med. Łukasza Galusa, spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki medyczne, potwierdza jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym opiniuję rozprawę pozytywnie i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Bernadety Drymel do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Wrocław, 03 sierpnia 2026 r.

dr hab. n. med. Bożena Cybulska-Stopa, prof. PWr

- 000001614 -
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
Wydział Medyczny
Katedra Onkologii i Hematologii
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
NIP 8960005851

Kierownik Katedry Onkologii i Hematologii
dr hab. n. med. Bożena Cybulska-Stopa, prof. ucz.