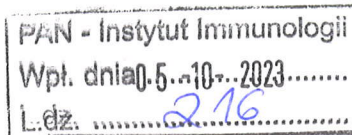




Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W POZNANIU**

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Poznań, 28.09.2023

Prof. UPP dr hab. inż. Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej
pt. „Zmiany składu mikrobiomu jelitowego, poziomu markerów enterotoksyny i
metabolitów bakteryjnych w przebiegu nowotworów u myszy”**

wykonanej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk
w Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
pod kierunkiem dr hab. Bogumiły Szponar, prof. IITD

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda podjętą na 192 posiedzeniu, przeprowadzonym w dniu 1 marca 2018 roku w związku przewodem doktorskim pani mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej wszczętym w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Recenzja uwzględnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zmianami).

Dobór i znaczenie tematu

Rosnąca dynamicznie, zwłaszcza w ostatnich latach, liczba chorych na choroby określane mianem cywilizacyjnych, skłania naukowców do badań mających na celu wyjaśnienie ich podłoża. W tym kontekście coraz częściej badana jest rola mikrobioty jelitowej. Jej udział w regulacji wielu zaburzeń metabolicznych jest bezsporny. W komunikacji mikrobioty jelitowej z organizmem człowieka kluczową rolę odgrywają produkty metabolizmu bakterii oraz składniki ich błon komórkowych. Rodzaj i ilość związków uczestniczących w utrzymywaniu homeostazy zależy zatem m.in. od składu drobnoustrojów zasiedlających jelita, który niestety cechuje się dużą zmiennością. Zmiany mikrobioty jelitowej są szczególnie silne podczas toczących się w organizmie procesów zapalnych. Monitorowanie zmian składu i aktywności mikrobioty jelitowej może być zatem źródłem informacji o kondycji organizmu człowieka oraz rokowań w przypadku wystąpienia w nim stanów chorobowych. Aby jednak ocena stanu mikrobioty jelitowej mogła być wykorzystana do celów diagnostycznych, niezbędne jest zebranie szczegółowych danych na temat jej zmian podczas procesów

chorobowych oraz ustalenie/opracowanie markerów do ich wykrywania. Instygująca jest również możliwość manipulowania składem mikrobioty jelitowej, choćby za pomocą diety i poprzez to łagodzenia stanów zapalnych przewodu pokarmowego zwiększających ryzyko rozwoju nowotworów. W taką właśnie problematykę, wpisuje się rozprawa doktorska pani mgr inż. A. Czajkowskiej. Ze względu na charakter i kierunek podjętych w niej badań, stanowi ona doskonałe uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat roli mikrobioty jelitowej w kancerogenezie nowotworu jelita grubego oraz czynników oddziałujących na jej przebieg. Ma ona również zarysowany potencjał aplikacyjny, na co zwrócić uwagę w dalszej części recenzji.

Ocena strony formalnej pracy i uwagi ogólne

Praca doktorska pani mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej jest obszernym opracowaniem, złożonym z 211 stron maszynopisu. Przedstawiono w niej bardzo bogaty i jednocześnie wielowymiarowy materiał wynikowy, który może być przedmiotem kolejnych interesujących analiz. W pracy zamieszczono 56 tabel oraz 62 rysunki, na które składa się 50, niejednokrotnie złożonych wykresów, 7 klasycznych rysunków, 4 schematy, 1 fotografia oraz 1 nienumerowany rysunek (str. 101). Struktura rozprawy jest typowa dla prac o charakterze doświadczalnym. Rozprawa jest podzielona na 9 rozdziałów, w których przedstawiono przegląd literatury (wstęp), cel pracy, materiały i metody badawcze, omówienie wyników badań, dyskusję, wnioski oraz spis literatury. Oprócz tego w rozprawie zamieszczono streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, krótkie wprowadzenie oraz wykaz stosowanej aparatury. W mojej ocenie percepcję treści pracy ułatwiłyby dodatkowy wykaz skrótów, zwłaszcza tych wprowadzonych na potrzeby pracy (np. DC, DW, DS, P, DJ, DJ-DS, DJ-DW, K-DS, itp.). W dysertacji zacytowano 279 pozycji literaturowych, w większości z ostatniej dekady. Pozycje bibliograficzne zostały starannie wyselekcjonowane, choć według mnie udział prac opublikowanych po 2020 roku, zwłaszcza eksperymentalnych, mógł być trochę większy. Odnośniki literaturowe są umieszczone prawidłowo, natomiast znajdujące się w treści pracy odsyłacze do tabel, rysunków oraz rozdziałów, nie zawsze poprawne (np. str. 78; „rozdz. 2.3.2.5, rozdz. 3.8” – w pracy nie ma wymienionych rozdziałów). Tytuł pracy jest zwięzły i dobrze odzwierciedla jej treść, a zwłaszcza kierunek przeprowadzonych badań. Geneza pracy jest dobrze wyjaśniona i bezpośrednio powiązana z celem badań, który jednak w mojej ocenie można było lepiej sformułować. W części doświadczalnej pracy najważniejsze wyniki i związane z nimi konkluzje zostały wyraźnie uwypuklone (podane w formie podsumowania na końcu każdego podrozdziału). Rozprawa jest dobrze przygotowana od strony graficznej, chociaż dla większej czytelności niektóre wykresy mogły być trochę większe (nie wszystkie dane na wykresach, zwłaszcza kołowych, są widoczne i poprzez to możliwe do analizy). Poza tym tabele i wykresy są często zamieszczone w pracy kilka stron po ich opisie (np. strona 23 zawiera opis tabel 1-3 zamieszczonych dopiero na stronie 26, odwołanie do tabeli 4 jest na stronie 27, a sama tabela na stronie 31, itd.). Zauważyłam również, że doktorantka omawiając wyniki badań dysertacyjnych (prawdopodobnie przez ostrożność) używa nietypowych określeń: „nasze badania”, „stwierdziliśmy”, „zastosowaliśmy”, „uzyskaliśmy”, itp., zamiast np. formy bezosobowej: przeprowadzone badania, zastosowano, stwierdzono, uzyskano. W pracy znajduje się też sporo błędów edytorskich i stylistycznych, a dwa rozdziały: 6.3.7 i 6.3.8 mają identyczny tytuł. Ponadto tytuły rozdziałów, przede wszystkim metodycznych i wynikowych, niepotrzebnie są aż tak długie (powielają informacje zawarte w rozdziałach głównych), a w sposobie ich tworzenia brakuje konsekwencji (stosowania przejrzystego schematu i takiej samej nomenklatury).

Podsumowując stwierdzam, że mimo pewnych niedociągnięć rozprawa mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej pod względem formalnym spełnia wymagania stawiane dysertacjom na stopień naukowy doktora, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera komplet wymaganych

rozdziałów. Ponadto stanowi zwartą całość i jest napisana poprawnym, choć nie zawsze precyzyjnym językiem.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana praca autorstwa mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej koncentruje się na badaniu zmian zachodzących w składzie i aktywności mikrobioty jelitowej podczas indukowanych u myszy procesów nowotworowych. Dodatkowo pokazuje jaki wpływ na mikrobiotę jelitową, a poprzez to i przebieg procesu zapalnego związanego z kancerogenezą ma zwiększenie udziału w diecie błonnika pokarmowego.

Pracę rozpoczyna 38 stronicowy wstęp literaturowy, który dobrze wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Zauważam, że jego bazą była praca Czajkowska i Szponar (2018); Postępy Hig. Med. Dośw. 72:131-142. Wstęp literaturowy składa się z czterech podrozdziałów. Najpierw krótko omówiono w nim skład i rolę mikrobiomu jelitowego. Pokazano interakcje zachodzące pomiędzy mikrobiotą jelitową, a układem odpornościowym gospodarza, silnie akcentując w nich udział krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz lipopolisacharydów (LPS) ściany komórkowej bakterii gramujemnych. Informacje te w połączeniu z danymi dotyczącymi czynników wpływających na przebieg kancerogenezy, dodatkowo podkreśliły znaczenie badań mgr inż. A. Czajkowskiej oraz trafność wyboru SCFA i 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OHFAs) jak swoistych biomarkerów. Następnie przedstawiono szlaki biosyntezy SCFA. Zwrócono też uwagę na możliwość transformacji SCFA w jelitach (zjawisko cross-feeding) oraz problemy analityczne związane z określeniem rzeczywistego poziomu produkcji tych związków w przewodzie pokarmowym. Ponadto dokładnie omówiono budowę LPSu, jego immunogenność oraz znaczenie w badaniach nad kancerogenezą. Przedstawiono też modele i metody stosowane do oceny stanu mikrobiomu jelitowego, w tym metody pośrednie. Weryfikacja ich przydatności jako narzędzia diagnostycznego do monitorowania przebiegu procesów nowotworowych stała się też dodatkowym celem badań dysertacyjnych. Treść całego przeglądu literaturowego wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne mgr inż. A. Czajkowskiej do pracy eksperymentalnej. Dane zebrane w części teoretycznej pracy zostały ponadto wykorzystane do zaplanowania zasadniczych badań, tj. pozwoliły na wybranie dobrych modeli badawczych, biomarkerów oraz narzędzi analitycznych.

Do monitorowania zmian zachodzących w składzie i aktywności mikrobioty jelitowej wybrano myszy model nowotworu prostaty (podskórny) i jelita grubego (podskórny i dojelitowy), a jako dodatkowe biomarkery - SCFA (metabolity mikrobioty jelitowej) oraz 3-OHFAs o długości łańcucha 10-18 atomów C (komponenty lipidu A). Ich poziom oznaczano chromatograficznie stosując odpowiednio techniki HPLC i GC-MS. Dodatkowo z wykorzystaniem testów ELISA oznaczano poziom receptorów wiążących wolne kwasy tłuszczowe: GPR43 i GPR109A, poziom produktów deacetylazy histonowej (HDAC) oraz sześciu cytokin pro- i przeciwzapalnych (TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-6, IL-12/IL-23, IL-17A). Dokładny skład taksonomiczny mikrobioty jelitowej w pierwszych eksperymentach określano z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF, a następnie wykonując NGS. Opis ww. metod analitycznych jest dokładny, choć w niektórych fragmentach według mnie przydałyby się jeszcze dodatkowe odwołania literaturowe, np. dotyczące profili 3-OHFAs charakterystycznych dla poszczególnych - analizowanych w pracy rzędów bakterii. W rozdziale „Materiały i metody” dostrzegam też inne drobne niedociągnięcia. Brakuje w nim np. informacji o pochodzeniu α -celulozy i skrobi ziemniaczanej. Charakterystyka tych produktów mogłaby pomóc w zrozumieniu ich działania oraz być kluczem do wyjaśnienia niektórych pozornie atypowych zjawisk, zarejestrowanych w pracy. W opisie sposobu wykonania badań (str. 56) oraz dyskusji wyników (str. 177) znajduje się jedynie wzmianka o tym, że testowaną

skrobia ziemniaczaną była „w znacznym stopniu oporna na trawienie skrobia typu 2”. Z treści pracy oraz załączonych schematów (rys 8-10) wynika, że SCFA w doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP, oznaczono zarówno w próbkach kału, jak i surowicy. W rozdziale 4.7 pt. „Oznaczanie SCFA ...” brakuje więc informacji dotyczących detekcji SCFA w surowicy. Dla większej precyzji warto było również wyjaśnić różnice pomiędzy oznaczanymi 3-OHFAs (symbole *i* i *nC*...) oraz omówić sposób pobierania tkanek do analiz. Z opisu metodyki badań nie wynika też jednoznacznie ile próbek pobierano do poszczególnych badań (zwłaszcza tkanek) oraz czy wykonywano powtórzenia techniczne. Takie informacje powinny być podane nie tylko w metodyce, ale i załączone do prezentowanego materiału wynikowego (*n*, średnia, odchylenie standardowe). Bez nich trudno jest bowiem ocenić wagę odkryć doktorantki. Wyjaśnienia wymagają nie tylko kwestie dotyczące jednorodności/zróżnicowania badanego materiału, ale i pominięte w metodyce zagadnienia dotyczące, np. sposobu monitorowania „wzrostu guzów nowotworowych”. W pracy co prawda nie podano wyników takich pomiarów, ale wielokrotnie wspomniano o nich w opisie wyników i dyskusji, podkreślając ich związek z oznaczonymi parametrami. Silnie akcentowano też, że „wykryte korelacje były najbardziej widoczne w okresie największego rozrostu guzów nowotworowych”. Szkoda, że w pracy nie zamieszczono choćby zdjęć dokumentujących ww. obserwacje. Ciekawią mnie również kwestie dotyczące śmiertelności oraz ogólnej kondycji zdrowotnej myszy w trakcie eksperymentów (czy miała ona przełożenie na wyniki wykonywanych oznaczeń?). Kolejna nieścisłość dotyczy analizy zmienności mikrobioty jelitowej. Zauważam bowiem, że doktorantka na podstawie wyników oznaczeń jakościowych (MALDI-TOF MS i NGS) orzekła o zmianach liczebności/liczby/liczności wykrytych grup bakterii. Przykładowo podawała, że „... następował spadek liczebności ...”, „stwierdzono wzrost ...”, czy, że „Obecność celulozy w paszy promowała wzrost *Akkermansia muciniphila* i hamowała wzrost *Lactobacillus reuterii*” (wniosek 5). W rzeczywistości rejestrowano jedynie zmiany układu/profilu mikrobioty jelitowej oraz proporcji wchodzących w jej skład - wybranych grup bakterii. Wnioskowanie doktorantki dotyczące zmian liczebności wskazanych bakterii jest więc jedynie iluzoryczne zwłaszcza, że nie zostało ono poparte analizą zmian bioróżnorodności mikrobiomu jelitowego. W tym miejscu nasuwa mi się kolejne pytanie: czy na wykresach (Rysunek 20) przedstawiono wszystkie wykryte typy bakterii? W kontekście analizy głównych składowych badanych mikrobiomów wyjaśnienia wymaga również rysunek 23. Co oznaczają zamieszczone na nim skróty? Nie udało mi się też rozszyfrować skrótów: etap 0, I i II zamieszczonych na rysunkach 45 i 52. Mam jeszcze kilka drobnych uwag nurty techniczno-językowej. W całej pracy niepotrzebnie powtarzane są pełne nazwy metod i/lub scalane ze skrótami, np. „testy immunoenzymatyczne ELISA”, zamiast po prostu testy ELISA, „sekwencjonowanie NGS”, zamiast NGS, „analiza z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF MS”, zamiast tylko analiza MALDI-TOF MS. Poza tym w pracy niekiedy rzędy bakterii, są błędnie nazywane typami (np. str. 112). Zastanawiam się też jakie znaczenie ma kolorystyka zastosowana do markowania danych w tabelach, która jak sądzę miała pomóc w analizie danych (nie znalazłam klucza do niej).

Dalsze uwagi dotyczą rozdziału pt. „Cel pracy”. W mojej ocenie przedstawiony w nim cel pracy nie odzwierciedla w pełni istoty przeprowadzonych badań; nie pokazuje ich układu oraz silnego powiązania analizowanych czynników (ich hierarchii). Wkradł się też do niego błąd, ponieważ w pracy nie badano interakcji (odziaływań) tylko korelacje (powiązania) pomiędzy badanymi parametrami, a w zasadzie starano się ustalić czy w ogóle one istnieją. Z uwagi na złożoność, wieloaspektowość i wielowymiarowość przedmiotowej pracy oraz, budzący mój szczerzy szacunek, ogrom wykonanych analiz, dobrym rozwiązaniem byłoby wydzielenie zadań badawczych. Zawarta w celu pracy hipoteza badawcza, mogła być też podana w postaci odrębnego zapisu tym bardziej, że to właśnie niej podporządkowane były

badania dysertacyjne (ustalenie czy istnieją korelacje pomiędzy ... , czy istnieje możliwość wykorzystania zaproponowanych w pracy oznaczeń do badania zmienności mikrobiomu jelitowego, a przez to i ..., w jaki sposób dieta wysokobłonnikowa wpływa na ..., czy stan zapalny ma przełożenie na ... itp.).

Pragnę jednocześnie zaznaczyć, że powyższe uwagi w żaden sposób nie negują założeń badań, ani tym bardziej nie podważają ich zasadności. Mają jedynie na celu wyjaśnienie zasygnalizowanych zagadnień.

Rezultaty badań będących podstawą dysertacji, zostały przedstawione w 40 tabelach oraz na 46 wykresach, złożonych w sumie z aż 146 mniejszych. Zauważam jednak, że te same dane zostały zamieszczone w tabelach oraz na wykresach (ich tytuły są nawet identyczne). Co więcej, wykresy przygotowano w kilku ujęciach; zestawiono na nich „surowe” wyniki oraz wyniki poddane obróbce statystycznej z wykorzystaniem różnych testów. Fakt ten bardzo utrudnia analizę i tak niebotycznej ilości danych. Dla większej przejrzystości „surowe” wyniki oznaczeń można przenieść do załącznika, a w części wynikowej pracy zamieścić jedynie wykresy z danymi będącymi przedmiotem wnioskowania. Słabym punktem pracy jest opis wyników analizy statystycznej. Jest w nim szereg niedomówień oraz skrótów myślowych przez co w wielu miejscach jest on mało czytelny. Przykładowo, str. 80 „Porównanie stężenia markerów LPS na poziomie rzędów wykazało, że myszy z nowotworem w obu grupach (TAMP-C1 i TAMP-C2) charakteryzowało istotnie niższe stężenie markerów, czy str. 87 „W tabelach (Tab. 22,23,24) wykazano istotne statystyczne różnice między rodzajami”. Autorka w pracy wspomina też (str. 170) o dodatkowych „wewnętrznych korelacjach”? Poza tym w pracy nie wyjaśniono skrótów R, t(N-2). Krzywych regresji nie opisano modelami matematycznymi, nie podano też współczynników ich dopasowania. Sposób omawiania wyników przeprowadzonych analiz statystycznych ograniczono jedynie do stwierdzania czy korelacja jest ujemna czy dodatnia. Nie zwrócono natomiast uwagi na wartość współczynników korelacji, przez co pominięto wiele interesujących kwestii. Według mnie dobrym uzupełnieniem materiału wynikowego mogłaby być ocena gradacji wpływu czynników uznanych za istotne na skład mikrobiomu jelitowego i przebieg badanych procesów nowotworowych.

Cześć wynikowa dysertacji składa się z trzech podrozdziałów. W pierwszym z nich przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na mysim modelu nowotworu prostaty. By dobrze ocenić wpływ kancerogenezy na skład i aktywność mikrobioty jelitowej, myszom zaaplikowano komórki nowotworowe o różnej inwazyjności (TRAMP-C1 i TRAMP-C2). Przeprowadzone badania potwierdziły istnienie związku na osi mikrobiota jelitowa-system immunologiczny-prostata. Zmianom hodowlanej mikrobioty jelitowej (identyfikowanej metodą MALDI-TOF MS), pogłębiającym się wyraźnie w miarę rozwoju choroby, towarzyszył wzrost stężenia kwasu masłowego, octowego i propionowego w kale oraz spadek zawartości 3-OHFAs typowych dla *Bacterioidales* i *Fusabacterales*. Co ciekawe w modelu tym nie stwierdzono w kale istotnych zmian stężenia 3-OHFAs *Enterobacterales*, zwykle wiązanych z przebiegiem procesu zapalnego. Dostrzeżone przez doktorantkę i dobrze opisane w dyskusji wyników mankamenty ww. badań były bodźcem do zaplanowania kolejnych, dużo bardziej złożonych eksperymentów. Przeprowadzono je tym razem w modelu nowotworu związanego bezpośrednio z układem pokarmowym, tj. nowotworu jelita grubego. Komórki nowotworowe MC38/EGFP i w tym przypadku podano myszom podskórnie. Zmiany mikrobiomu jelitowego badano wykonując NGS oraz MALDI-TOF MS. Dodatkowo zawartość SCFA i 3-OHFAs oraz ich profil oznaczono w surowicy. Poza tym by wpłynąć na kierunek i wielkość zmian zachodzących w mikrobiomie jelitowym podczas procesu zapalnego, do układu doświadczalnego wprowadzono dodatkową zmienną. Była nią zawartość α -celulozy w paszy; podwyższono ją ze standardowego poziomu 5 do 20%. Zmienna ta okazała się być kluczowa dla przebiegu dalszych badań. Tak rozbudowany układ doświadczalny według mnie dowodzi ambicji naukowych doktorantki i jej promotora oraz

wyraźnie wskazuje na ich zdefiniowane dążenia poznawcze, zwięźczone zresztą sporym sukcesem. Dzięki ww. badaniom udało się m.in. stwierdzić, że modyfikacja diety modulowała układ mikrobioty jelitowej silniej niż sam proces nowotworowy. Przykładowo, zwiększała w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem MC38/EGFP udział *Bacteroidetes* i *Akkermansia muciniphila*, natomiast obniżała *Firmicutes* w tym *Lactobacillus reuterii*. Skutkowała też zwiększeniem w kale stężenia kwasu mlekowego i masłowego. Podobnych zmian nie obserwowano w surowicy, prawdopodobnie z uwagi na dysfunkcję przewodu pokarmowego spowodowaną toczącym się procesem nowotworowym, który jednocześnie wyraźnie zmienił profil SCFA. W tym miejscu zastanawia mnie, sięgającą nawet 10^7 razy, różnica pomiędzy stężeniem kwasu mlekowego (LA) w kale i surowicy. Dlaczego w surowicy LA było aż tak dużo i jednocześnie zdecydowanie więcej niż pozostałych SCFA? Nie do końca przemawia do mnie też wyjaśnienie doktorantki dotyczące przewagi badania kału nad surowicą w kontekście oceny kondycji mikrobiomu jelitowego tym bardziej, że to właśnie w parametrach oznaczanych w surowicy, bardziej widoczne były nieprawidłowości związane z jego funkcjonowaniem (metabolizmem SCFA). Interesujących danych dostarczyła analiza zawartości 3-OHFAs (markerów LPS). Doprowadziła ona do stwierdzenia, że zwiększenie podaży celulozy obniża, zarówno w kale jak i w surowicy, stężenie 3-OHFAs wszystkich badanych bakterii gramujemnych, jednak najbardziej *Bacteroidales*. Pomiedzy 15, a 30 dobą badań, tj. w „okresie intensywnego rozwoju guzów”, dodatkowo we wszystkich grupach obserwowano podwyższenie poziomu badanych markerów LPS. Zjawisko to wykrywano jednak jedynie w kale, stąd ciekawi mnie dlaczego doktorantce „Wydaje się, że translokacja bakterii patogennych ze światła jelita do krwioobiegu u zwierząt chorych była znacznie zwiększona podczas stosowania paszy standardowej ...” (str. 119). Tego przypuszczenia nie potwierdzają dane zestawione w tabeli 34 (poziom markerów jest tam relatywnie stały). Uzupełnieniem ww. badań są wyniki MALDI-TOF MS (zamieszczone na końcu rozdziału 6.2). Niestety jeszcze bardziej skomplikowały one obraz zmian zachodzących w badanym układzie. W opisie wyników identyfikacji MALDI-TOF wspomniano, że 23 izolaty były wspólne dla wszystkich próbek. Nie wymieniono ich jednak, ani nie zaznaczono w tabeli 39. Zwięźczeniem ocenianej pracy są bardzo ambitne badania przeprowadzone na modelu nowotworu jelita grubego (MC38/0) indukowanego podskórnie i dojelitowo. W badaniach tych doktorantka świetnie wykorzystała zdobyte doświadczenia. Wskazuje na to choćby zaproponowany przez nią rozbudowany i bardzo dojrzały naukowo model badawczy. Dotychczasowe badania uzupełniła bowiem o analizę dodatkowych markerów procesów zapalnych. Poprzez to starała się jeszcze lepiej wyjaśnić rolę zmian mikrobioty jelitowej oraz jej metabolitów w promowaniu i supresji nowotworu jelita grubego. Oprócz tego słusznie zmieniła źródło błonnika pokarmowego na skrobię typu 2 oraz rozszerzyła pulę analizowanych SCFA. W ten sposób udało się jej zarejestrować szereg ciekawych i często zaskakujących zjawisk. Podjęła też próbę wyjaśnienia ich związku z dietą, lokalizacją nowotworu oraz jego stadium. Z uwagi na złożony układ eksperymentów oraz dużą dynamikę zmian badanych parametrów, analiza zebranego materiału wynikowego była bardzo trudna, a wnioski będące ich wypadkową nie zawsze niejednoznaczne, a nawet możliwe do sformułowania. Przykładowo, w surowicy myszy z nowotworem wszczepionym dojelitowo, niezależnie od sposobu żywienia, pomiędzy 9, a 20 dobą badań (a nie jak podano w pracy w 20 i 35 dniu) stwierdzono wysoki poziom prozapalnych cytokin – IL-17 oraz IL-12/17, a u myszy z dietą wysokobłonnikową również INF- γ i IL-10 o działaniu przeciwzapalnym. Poziom większości prozapalnych cytokin był przy tym wyższy w grupach żywionych paszą wysokobłonnikową. W tym miejscu docenić pragnę pracę jaką doktorantka włożyła w poszukiwanie korelacji pomiędzy SCFA, 3-OHFA, poziomem receptorów GPR43 i GPR109A oraz cytokin. Muszę się też przyznać, że geneza parowania ze sobą niektórych czynników nie była dla mnie jasna. Dobrze jednak, że w tym zakresie doktorantka wykazała odwagę naukową i sporą

kreatywnością. Dzięki temu udało się jej wykryć szereg pozornie niemożliwych korelacji. Sporym zaskoczeniem była dla mnie też ilość wykrytych powiązań. Dowodzi to najlepiej z jak trudnym materiałem wynikowym przyszło się doktorantce mierzyć. Przedstawiony w dysertacji materiał wynikowy, mimo czasu jaki upłynął od zakończenia eksperymentów, może być nadal punktem wyjścia do kolejnych ciekawych badań. Według mnie to jego ogromny atut. Przykładowo daje on możliwość szukania korelacji pomiędzy kolejnymi, nieuwzględnionymi czynnikami, takimi jak np. stadium choroby, czy profil mikrobioty. Może być on również przeanalizowany w układach wieloczynnikowych z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi bioinformatycznych.

Wyniki badań dysertacyjnych mgr inż. A. Czajkowska poddała analizie w odniesieniu do dostępnej literatury. Z merytorycznego punktu widzenia dyskusja wyników została przeprowadzona poprawnie. Doktorantka nawiązała w niej do wyników badań innych autorów o podobnym charakterze. Na tle badań innych autorów mogła jednak silniej zaakcentować swoje odkrycia oraz pokazać, które z nich wymagają dalszych badań (np. ekspresja GPCRs). Brak zarysowania dalszego kierunku badań związanych z przedmiotem pracy, oczywiście w żaden sposób nie umniejsza wartości dokonań naukowych doktorantki.

Podsumowaniem dysertacji jest 8 wniosków. Niektóre z nich według mnie wymagają doprecyzowania. Przykładowo wnioski 1 i 2 w formie zamieszczonej w pracy wydają się sprzeczne. Nie wynika z nich jednoznacznie, który z czynników silniej modulował skład mikrobioty jelitowej - dieta, czy proces nowotworowy oraz czy zmiany indukowane przez dietę wysokobłonnikową były korzystne. Wnioski 4 i 6 wymagają także przeformatowania – podkreślenia wpływu źródła błonnika na kierunek oddziaływań. Wniosek 8 (zważywszy na dużą zmienność wyników) warto złagodzić - podkreślić w nim jedynie potencjał wyników badań (potwierdziły vs. możliwość wykorzystania). Może warto także wspomnieć jakie dokładnie korelacje mają największe znaczenie praktyczne oraz w formie dodatkowego wniosku przedstawić odkrycia związane ze zmianami mikrobioty jelitowej oraz „procesami zapalnymi”.

Na koniec pragnę jeszcze raz zaznaczyć, że wszystkie poczynione przeze mnie uwagi nie dotyczą kwestii o istotnym znaczeniu merytorycznym. Mają one jedynie formę luźnych refleksji, sugestii i pytań, które zostały podyktowane ciekawością recenzenta oraz chęcią wywołania dyskusji z doktorantką.

Reasumując, całą dysertację oceniam wysoko. Doceniam trud wniesiony w jej powstanie, zakres i jakość przeprowadzonych prac eksperymentalnych oraz wielokierunkowość podejść do analizowanego zagadnienia. Doktorantka osiągnęła założone cele badawcze uzyskując wyniki o znacznej wartości poznawczej. Jej praca jest dobrym uzupełnieniem wiedzy temat związku kondycji mikrobioty jelitowej z procesami zapalnymi towarzyszącymi kancerogenezie. Dodatkowo zaproponowane w niej szybkie i nieinwazyjne badania mają potencjał diagnostyczny.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Aleksandry Czajkowskiej pt. „Zmiany składu mikrobiomu jelitowego, poziomu markerów enterotoksyny i metabolitów bakteryjnych w przebiegu nowotworów u myszy”, **spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym w zakresie nauki** (tj. Dz.U. 2017. poz.1789). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o **dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**