



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Nauk o Zdrowiu  
Zakład Nauk Podstawowych  
dr hab. n. med. Dorota Diakowska, prof. uczelni

Wrocław, dn. 31.01.2023 r.

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Szymczaka pt.  
„Viral and bacterial components of the human microbiome: profiling in selected  
gastrointestinal disease states”  
„Wirusowe i bakteryjne składniki mikrobiomu ludzkiego: profilowanie w wybranych stanach  
chorobowych przewodu pokarmowego”  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej z Instytutu Immunologii  
i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu

### Ocena wyboru tematu

Badania dotyczące mikrobiomu człowieka rozumianego jako zbiór genomów wszystkich drobnoustrojów bytujących w ludzkim organizmie, budzą w ostatnich latach duże zainteresowanie. Na podstawie wyników licznych artykułów naukowych można wnioskować, że mikroorganizmy zasiedlające ciało człowieka mają istotny wpływ na zapewnienie homeostazy naszego organizmu, a zmiany w składzie mikrobiomu człowieka mogą sygnalizować lub pośrednio indukować występowanie różnych chorób. Postęp metod i technik izolacji materiału genetycznego mikrobiomu, tzw. sekwencjonowanie nowej generacji (*Next Generation Sequencing, NGS*) zrewolucjonizował dotychczasową wiedzę dotyczącą m. in. mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka.

W recenzowanej pracy scharakteryzowano bakteryjny i wirusowy mikrobiom ludzki pochodzący ze środowiska przewodu pokarmowego oraz wykonano profilowanie składu tego mikrobiomu w zależności od wybranych stanów chorobowych przewodu pokarmowego. Wykonane badanie ma charakter badania klinicznego, zrealizowanego przy użyciu nowoczesnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej, metagenomiki bazującej na sekwencjonowaniu nowej generacji (*NGS*) i bioinformatyki. Temat podjęty przez Doktoranta jest istotny, ponieważ zastosowana przez Niego metoda *NGS*, ze względu na możliwość sekwencjonowania wielu próbek jednocześnie, możliwość badania mikroorganizmów niehodowlalnych w warunkach laboratoryjnych, zwiększenie czułości i specyficzności badania

oraz obniżenie kosztów badania, staje się obecnie podstawowym narzędziem w diagnostyce genetycznej, zastępując dotychczasowe metody, szczególnie w przypadku schorzeń o trudnym do ustalenia podłożu genetycznym.

### **Charakterystyka formalna rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr A. Szymczaka została napisana w języku angielskim. Praca liczy 150 stron, zawiera 21 tabel, 21 rycin i 287 pozycji piśmiennictwa. Na początku rozprawy znajduje się informacja, że część wyników pracy została opublikowana w artykule:

- 1) Szymczak A, Ferenc S, Majewska J, Miernikiewicz P, Gnus J, Witkiewicz W, Dąbrowska K. Application of 16S rRNA gene sequencing in *Helicobacter pylori* detection. PeerJ. 2020 May 13;8:e9099. doi: 10.7717/peerj.9099. PMID: 32440373; PMCID: PMC7229771.

o współczynniku IF=2.984 i punktacji MEiN=100.

Wyniki badań były także prezentowane na 4 konferencjach naukowych:

- 1) "Transfer between ecological niches within human body: how gut phageome expands to serum phageome". Szymczak A, Gnus J, Ferenc S, Miernikiewicz P, Majewska J, Gembara K, Strapagiel D, Stączek P, Dąbrowska K, Viruses of Microbes 2022, Abstract Book, p 167
- 2) "Correlation between SNPs in human genomes and bacterial and viral complexity of human microbiome". Szymczak A, Gembara K, Ferenc S, Strapagiel D, Majewska J, Miernikiewicz P, Lach J, Gnus J, Stączek P, Witkiewicz W, Dąbrowska K, EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology 7-9.06.2021, Online Abstract Book
- 3) "Comparison of human stomach microbiome and virome fractions". Szymczak A, Ferenc S, Miernikiewicz P, Majewska J, Gnus J, Witkiewicz W, Dąbrowska K Oxford Bacteriophage Conference – Phages 2019, 11-12.09.2019, Oxford UK, Book of Web p. 36
- 4) "Microbiome comparison of *Helicobacter pylori* infected and non-infected patients" Szymczak A, Majewska J, Ferenc S, Miernikiewicz P, Witkiewicz W, Dąbrowska K. Microbiome Microbiome comparison of *Helicobacter pylori* infected and non-infected patients. 8th International Weigl Conference, 26-28.06.2019, Łódź, Abstract Book p. 130

Rozprawa doktorska została podzielona na część początkową obejmującą: użyte skróty, spis materiałów laboratoryjnych, spis aparatury badawczej, zgodę komisji bioetycznej, spis tabel, spis rycin, spis wzorów matematycznych. Następnie w rozprawie znalazły się kolejno rozdziały: Wstęp, Materiały, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografia. Mam dwie uwagi dotyczące formalnej budowy rozprawy doktorskiej. Pierwsza uwaga dotyczy braku rozdziału *Cel badania*, który powinien znaleźć się za rozdziałem *Wstęp*. Druga uwaga dotyczy tytułu rozdziału *Materiały*, który powinien nosić nazwę *Material i metody*. Poniżej w części merytorycznej recenzji omówię szczegółowo te dwie uwagi.

### **Ocena merytoryczna**

Tytuł rozprawy doktorskiej jest zgodny ze zrealizowanym przez mgr A. Szymczaka badaniem, czego potwierdzeniem jest treść rozprawy doktorskiej.

W pierwszych trzech podrozdziałach *Wstępu* Doktorant omówił zagadnienia związane z formułowaniem definicji mikrobiomu człowieka, początkiem badań nad genomami drobnoustrojów zasiedlających poszczególne obszary ludzkiego ciała oraz charakterystyką mikrobiomu środowiska przyrodniczego otaczającego człowieka. W następnych podrozdziałach Autor dokładnie omówił metody sekwencjonowania DNA I, II i III generacji: metodę Sangera, pirosekwencjonowanie, jonowe sekwencjonowanie półprzewodnikowe, metodę sekwencjonowania przez syntezę firmy Illumina, sekwencjonowanie nanoporowe. Trzecia część *Wstępu* to opis mikrobioty całego ludzkiego organizmu, omówiony bardzo szczegółowo. W mojej opinii podrozdziały dotyczące mikrobioty środowiska przyrodniczego człowieka oraz mikrobiomu narządów czy obszarów ciała ludzkiego pozostających poza środowiskiem układu pokarmowego powinny być pominięte, ponieważ nie dotyczą tematu badania. We *Wstępie* powinny być omówione jedynie treści dotyczące mikrobioty i mikrobiomu przewodu pokarmowego. Muszę jednak przyznać, że cały rozdział napisany został z widocznym zaangażowaniem pisarskim i popularyzatorskim Autora.

Najpoważniejszym błędem recenzowanej rozprawy doktorskiej jest brak w niej jednego z najważniejszych rozdziałów obowiązujących w rozprawach naukowych czyli *Celu badania*. W rozdziale tym powinien znaleźć się jasno sformułowany cel badania oraz pytania badawcze lub hipotezy badawcze. Odpowiedni tekst z celem badania i problematyką badawczą mógłby ewentualnie być zamieszczony w ostatnim akapicie *Wstępu*. Natomiast brak tych elementów w pracy sprawia, że trzeba się domyślać, co Autor pracy zamierzał osiągnąć, jaki problem

badawczy zamierzał rozwiązać. Sam tytuł rozprawy doktorskiej nie wystarcza do określenia zakresu problematyki podjętego przez Doktoranta badania.

Kolejną częścią pracy jest rozdział zatytułowany przez Doktoranta *Materials*. Zdaniem Recenzenta rozdział ten powinien nosić tytuł *Material and methods*, ponieważ opisane zostały w nim przede wszystkim metody z zakresu biologii molekularnej użyte w badaniu. Materiał badania, jakim były próbki tkanki pozyskane z części odzwiernikowej żołądka podczas badania endoskopowego oraz próbki krwi, został w tym rozdziale opisany zbyt ogólnikowo. Uważam, że w tym miejscu rozprawy doktorskiej powinna znaleźć się charakterystyka demograficzna i kliniczna pacjentów, od których pozyskano próby do badań wraz klasyfikacją chorych do odpowiednich grup chorób w oparciu o Międzynarodową Statystyczną Klasyfikację Chorób ICD-10. Charakterystyka taka znajduje się na początku rozdziału *Wyniki*, jednak zdaniem Recenzenta nie są to wyniki badania lecz opis badanego materiału.

W kolejnych podrozdziałach *Materials* Autor opisał użyte metody badawcze z zakresu biologii molekularnej, metagenomiki i bioinformatyki. Mocną stroną przeprowadzonego badania są nowoczesne metody badawcze wykorzystane przez Doktoranta, m. in: izolacja DNA z materiału biologicznego, przygotowanie biblioteki dla sekwencjonowania genu markerowego 16S rRNA; metoda sekwencjonowania ampliconów genów bakteryjnych przy użyciu platformy i oprogramowania *Ion Torrent PGM system*; metoda sekwencjonowania genomów wirusowych przy pomocy technologii firmy *Illumina* i sprawdzanych przy użyciu programu FASTQC; oznaczanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) wybranych genów za pomocą *Ampliseq SNP*; wykonanie analiz bioinformatycznych z wykorzystaniem indywidualnych skryptów do testowania sekwencji genów 16S rRNA, genomów wirusów oraz identyfikacji polimorfizmów SNP i ich położenia w badanym genomie.

Prawidłowy dobór technik i metod badawczych pozwolił na pozyskanie przez Doktoranta danych, które zostały zanalizowane statystycznie. Analiza statystyczna danych została przeprowadzona prawidłowo, z wykorzystaniem dobrze dobranych testów i analiz statystycznych. Mam natomiast uwagę dotyczącą opisu statystycznego testu proporcji, który został przez Doktoranta zamieszczony w oddzielnym rozdziale (9.14), zamiast być podrozdziałem części 9.13 *Statistical analysis*. W opisie zastosowanych metod statystycznych brak jest też informacji o przyjętym przez Autora poziomie (lub poziomach) istotności statystycznej.

Rozdział *Wyniki* został napisany prawidłowo. Doktorant omówił w nim szczegółowo główne rezultaty przeprowadzonych badań, tj.: wyniki sekwencjonowania genomów bakteryjnych, w tym genu 16S rRNA, wyniki sekwencjonowania genomów wirusowych,

występowanie polimorfizmów SNP wybranych genów, wykazał obecność 14 korelacji pomiędzy składnikami bakteryjnymi żołądka a zdiagnozowanymi chorobami; wykazał obecność 3 korelacji między komponentami bakteriofagowymi a chorobami sklasyfikowanymi w ICD-10; wskazał na występowanie 13 współzależności pomiędzy polimorfizmami SNP a mikrobiomem bakteryjnym żołądka oraz 6 współzależności między polimorfizmami SNP a obecnością bakteriofagów z 4 określonych rodzin. Wyniki badań zostały przez Doktoranta pokazane przy pomocy nowoczesnych technik graficznych, co wpłynęło na istotne podwyższenie poziomu naukowego pracy.

Mam kilka uwag dotyczących rozdziału *Wyniki*:

1. W pierwszej części tego rozdziału, w akapicie dotyczącym charakterystyki demograficznej pacjentów liczba próbek poddanych badaniu ( $n=148$ ) nie jest zgodna z liczbą pacjentów ( $n=147$ ). Dlaczego wyjściowa liczba próbek krwi ( $n=141$ ) nie jest zgodna z liczbą pacjentów z grupy badanej?
2. W Tabeli 14 wartości statystyki  $t$  i wartości  $p$  powinny być zamieszczone w oddzielnych kolumnach. Natomiast informacja o wyznaczonym poziomie istotności powinna być umieszczona pod tabelą lub w tytule tabeli, nie powinna być natomiast powielana w każdej z komórek kolumny pt. *Significance*.
3. Należy również ujednoczyć pisownię wartości prawdopodobieństwa  $p$  i poziomów istotności  $\alpha$  w pracy, pisząc je z cyfrą 0 przed przecinkiem i z 4 cyframi po przecinku.

Nie mam uwag do kolejnego rozdziału pracy *Dyskusji*, którego treść umocniła moją pozytywną ocenę dotyczącą oryginalności i nowatorstwa przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

W rozdziale *Wnioski* Autor zamieścił 8 wniosków, będących odzwierciedleniem szerokiego zakresu uzyskanych wyników o wysokiej wartości naukowej. Jednak i do tej części pracy wkradł się błąd: wniosek 4 nie dotyczy wyników przeprowadzonego badania i nie powinien znaleźć się w tym rozdziale.

W rozprawie doktorskiej mgr. A. Szymczak zacytował 298 publikacji i doniesień naukowych, stosując harwardzki system cytowania artykułów. Zdecydowana większość, bo ok. 90% pozycji piśmiennictwa zostało opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat, a około 45% artykułów to publikacje z ostatnich 5 lat.

Streszczenia w języku polskim i angielskim zostały napisane prawidłowo.

W pracy doktorskiej występują drobne błędy językowe typu pominięcie cyfry, literówki, błędy w normalizacji czcionki. W żaden sposób nie obniżają one jednak wysokiej wartości naukowej pracy.

Ponieważ wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta badań zostały częściowo opublikowane w jednym recenzowanym czasopiśmie naukowym ze znaczącym IF, a wcześniej zostały poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów tego czasopisma, moja ocena rozprawy doktorskiej jest częściowo ułatwiona. Jako Recenzent uważam, że ocenianą rozprawę doktorską charakteryzuje nowatorskie ujęcie tematu badania przy wykorzystaniu nowoczesnych metod i technik badawczych z zakresu biologii molekularnej, metagenomiki i bioinformatyki, znakomita wizualizacja uzyskanych wyników badań oraz bardzo dobre opracowanie naukowe tematyki badawczej. Stwierdzam, że założony cel rozprawy doktorskiej został w pełni osiągnięty, a uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w aktualny stan wiedzy obejmujący dyscyplinę nauki medyczne.

### **Podsumowanie**

Pan mgr Aleksander Szymczak zrealizował zamierzony cel badania, wykorzystując prawidłowo dobrane metody i techniki badawcze. Wykazał się umiejętnością naukowego rozwiązywania problemu oraz aktualnym stanem wiedzy na opracowany temat. Pomijając wykazane przeze mnie błędy i uchybienia, oceniam rozprawę doktorską bardzo wysoko, a przeprowadzone badania zawierają bezsprzecznie elementy nowości.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr A. Szymczaka spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (tj. Dz.U. z 2021r., poz.478 ze zm.). Przedkładam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu **pozytywną ocenę** rozprawy doktorskiej oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr Aleksandra Szymczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Dorota Diakowska, prof. uczelni

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
ZAKŁAD NAUK PODSTAWOWYCH  
*D. Diakowska*  
dr hab. Dorota Diakowska, profesor uczelni