



dr hab. Sabina Górską
Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirsfelda
Polska Akademia Nauk
Weigla 12, 53-114 Wrocław

Wrocław, 16.07.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek pt.:

“Rola archeonów metanogennych w nieswoistych chorobach zapalnych jelit u dzieci.”

Praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Bożeny Cukrowskiej

oraz

dr hab. n. med. Edyty Szymańskiej

w Zakładzie Biochemii Klinicznej, Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

Strona formalna rozprawy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się z czterech wieloautorskich artykułów: jednej przeglądowej i trzech oryginalnych. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem co wskazuje na jej wiodącą rolę w ich powstaniu. Potwierdzają to również oświadczenia Doktorantki oraz pozostałych współautorów, które zostały umieszczone na końcu rozprawy. Wyniki będące podstawą oceny zostały opublikowane w latach 2023-2024, w czasopismach międzynarodowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF=19.1 i punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynoszącej 390 punktów.

Dokumentacja pracy doktorskiej składa się z następujących rozdziałów: **Streszczenie w języku polskim i angielskim**, **Słowa kluczowe w języku polskim i angielskim**, **Wykaz zastosowanych skrótów**, **Wstęp**, w którym Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swoich badań. Po nim następują: **Cel rozprawy doktorskiej**, który jest jasno sformułowany,

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland, contact: +48 71 370 99 30, +48 71 370 99 38, www.hirsfeld.pl

Centre of Excellence IMMUNE



The Leading National Research Centre,



Materiał, który przedstawia opis próbek zwierzęcych i ludzkich oraz **Metody**, będący opisem zastosowanych technik. Następnie Doktorantka załącza kopie czterech manuskryptów. Sekcje **Omówienie wyników i dyskusja oraz Wnioski** zawierają zwięzłe i rzeczowe podsumowanie każdej publikacji i najważniejsze osiągnięcia przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Rozprawę kończą **Piśmiennictwo, Spis tabel i rycin, Zgody komisji etycznych oraz Oświadczenia współautorów**.

Zabrakło mi przedstawienia hipotez rozprawy doktorskiej oraz szerszego przedyskutowania znaczenia jej wyników, wyzwań czy też dodatkowych badań jakie powinny zostać wykonane w przyszłości aby zrozumieć znaczenie archeonów metanogennych w etiopatogenezie chorób człowieka, w tym nieswoistych chorobach zapalnych jelit.

Ocena merytoryczna rozprawy.

Rozprawa doktorska miała na celu ocenę znaczenia archeonów metanogennych w nieswoistych chorobach zapalnych jelit u dzieci. Uważam, że tematyka pracy jest interesująca ze względu na fakt, iż nie wiele wiemy na temat archeonów i ich biologicznej roli. Początkowo uważano, że archeony należą do organizmów wyjątkowo ekstremofilnych, ponieważ pierwsze opisane organizmy z tej grupy izolowano ze środowisk o zdecydowanie niekorzystnych warunkach np. o wyjątkowo wysokich/niskich temperaturach, o bardzo niskim/wysokim wskaźniku pH czy zasoleniu. Obecnie wiadomo jednak, że mikroorganizmy te stanowią składnik mikroflory typowych środowisk naturalnych. Niezwykle ciekawe jest, że archeony mogą także zasiedlać organizmy zwierząt i człowieka, tym samym stanowią ważny składnik fizjologicznej mikroflory. Pomimo rosnącej wiedzy dotyczącej roli mikroorganizmów dla utrzymania prawidłowej homeostazy naszego organizmu czy też wskazywania na udział specyficznych mikroorganizmów w patogenezie wielu chorób np. metabolicznych, zapalnych czy neuropsychiatrycznych, nie wiele wiemy na temat roli jaką odgrywają archeony. Ich liczba jest stosunkowo niewielka, pomimo to mogą okazać się kluczowym elementem w badaniach nad rolą mikrobioty w etiopatogenezie różnych chorób np. nieswoistych zapaleń jelita. Pojęcie to obejmuje chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego. W wielu badaniach wykazano jakościowe i ilościowe zaburzenia w składzie mikrobioty jelitowej w przebiegu tych chorób. Dotychczasowe badania skupiały się przede wszystkim na udziale bakterii w patogenezie, jednak rzadko zwracano uwagę na to, że archeony mogą również



odgrywać ważną rolę w rozwoju choroby. W związku z tym uważam, że temat przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny.

W części oceny formalnej rozprawy doktorskiej wskazałam, że rozprawa ta składa się z cyklu czterech opublikowanych artykułów. W takiej sytuacji recenzent ma teoretycznie ułatwione zadanie, gdyż każda publikacja została poddana już wnikliwej ocenie rezydentów wyznaczonych przez redakcje czasopism. Niemniej jednak jako recenzent skupię się na ocenie spójności przedstawionych do oceny publikacji, wpływu ich na rozwój dziedziny i oryginalności podjętych przez Doktorantkę badań.

Pierwsza praca otwierająca cykl artykułów jest pracą przeglądową wprowadzającą w tematykę rozprawy doktorskiej. Poczynając od ogólnej charakterystyki archeonów, Doktorantka zapoznaje czytelnika z archeonami metanogennymi. Bardzo szczegółowo opisuje ich występowanie u ludzi, metody ich oznaczania i znaczenie dla naszego zdrowia opierając się o dostępną wiedzę w tym zakresie. Dalej koncentruje się nad opisem występowania archeonów metanogennych w nieswoistych zapaleniach jelit i ich potencjalnym udziałem w patogenezie tych chorób. Praca ta stanowi zwięzłe, ale dokładne omówienie poruszanych w rozprawie doktorskiej zagadnień i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się problemem, będącym przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje ilość literatury jaką wykorzystywała do przygotowania tej pracy (ponad 90 pozycji) oraz jej aktualność (większość z ostatnich 10 lat). Moja jedyna uwaga do tej pracy jest taka, że **zabrakło mi szerszego przedyskutowania możliwości oddziaływania archeonów z naszym układem odpornościowym np. w kontekście reakcji immunologicznych zaangażowanych w rozwój nieswoistych zapaleń jelit**. Mam również pytanie do Doktorantki **jak wytłumaczyłaby wzrost ilości archeonów u osób starszych?** Zarówno w dostępnej literaturze jak i w oryginalnych pracach Doktorantki, które stanowią część przedmiotowej rozprawy, wskazano, że wraz z wiekiem ilość archeonów rośnie. Obserwacja ta wydaje mi się dość interesująca.

Cel naukowy rozprawy doktorskiej został jasno przedstawiony. Był on realizowany w oparciu o trzy cele szczegółowe z wykorzystaniem odpowiednich metod badawczych i statystycznych. W pierwszym etapie istotne było dla Doktorantki opracowanie protokołu detekcji archeonów w próbkach biologicznych. Udało się jej zoptymalizować warunki analizy jakościowej archeonów metanogennych uzyskując zwiększoną swoistość i czułość. Bardzo szczegółowy proces optymalizacji warunków jest przedmiotem drugiej publikacji. Praca ta pokazała, że Doktorantka bez wątplenia posiada odpowiednią wiedzę w zakresie detekcji



mikroorganizmów metodą PCR oraz wskazała na jej umiejętność wyciągania krytycznych wniosków pozwalających na optymalizację protokołu. W trzeciej publikacji Doktorantka dokonała wstępnej oceny przydatności opracowanego protokołu detekcji archeonów wykorzystując próbki kałomoczu i treść jelitową kury domowej. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o bardziej szczegółowe wyjaśnienie dotyczące użytego modelu badawczego. **Dlaczego wybrano kurę domową?** Przyznam, że jest to dość nieoczywisty model zwierzęcy do badań naukowych. Chciałabym w tym miejscu wskazać na interesujące obserwacje jakie przedstawiła Doktorantka dotyczące istotnego wpływu czynników środowiskowych na występowanie archeonów w próbkach. Wskazała po pierwsze, że aby organizm został skolonizowany przez metanogeny konieczny jest kontakt ze środowiskiem, w którym mikroorganizmy te naturalnie bytują. Po drugie liczba archeonów wzrasta wraz z wiekiem zwierzęcia. Wydaje mi się, że interesujące byłoby również przedstawienie tych wyników na tle całej mikrobioty bakteryjnej przeprowadzając pełne sekwencjonowanie mikrobiomu. Pozwoliłoby to może na wskazanie pewnych zależności pomiędzy składem bakteryjnym mikrobioty a archeonami.

Ostatni artykuł z cyklu jest artykułem oryginalnym, w którym Doktorantka przedstawia analizę liczebności archeonów w kale dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit i porównuje uzyskane wyniki z grupą kontrolną. Dokonuje ona również oceny zależności między liczebnością archeonów a typem i stopniem aktywności choroby oraz wiekiem dzieci. Wskazuje, że ogólna liczebność metanogenów była obniżona u pacjentów chorujących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC) i chorobą Lesniowskiego-Crohna (CD) w stosunku do grupy kontrolnej. Dokonując bardziej szczegółowej analizy na poziomie gatunku zauważyła, że doszło do spadku jedynie liczby *Methanobrevibacter smithii* u pacjentów chorych na UC. Analiza korelacji aktywności choroby z liczbą archeonów nie wykazała istotnych statystycznie powiązań z wartościami indeksów PCDAI i PUCAI. Zastanawiam się, **czy została przeprowadzona analiza korelacji z poziomem konkretnych wskaźników PCDAI jak CRP, OB, czy albumina. Czy nie warto byłoby się również zastanowić nad oznaczeniem poziomu i korelacji z cytokiną TNF-alpha? Nie mogłam znaleźć charakterystyki pacjentów pod względem metod leczenia – czy była to jednorodna grupa tzn. czy użyte zostały takie same schematy leczenia?** Doktorantka w tym artykule ponownie zaobserwowała znaczące zmiany w ilości archenonów w zależności od wieku pacjentów. **Prosiłabym o szersze przedyskutowanie tych obserwacji. Jako immunobiolog zastanawiam się czy status układu**



odpornościowego może mieć tu znaczenie? Czy istnieje korelacja pomiędzy składem jakościowym i ilościowym archeonów na tle składu jakościowego i ilościowego mikroflory jelitowej? Chciałabym również poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie jak jej wyniki mogą w przyszłości zostać wykorzystane? Czy do diagnostyki? Czy może do śledzenia leczenia? Czy może wprowadzania rozwiązań terapeutycznych opartych o archeony? Jakie eksperymenty dodatkowe wykonałaby Doktoratka, gdyby chciała udowodnić, że proces zapalny towarzyszący nieswoistym chorobom jelitowym powoduje zmiany w składzie archeonów? Jaki model badawczy mógłby zostać użyty?

Podsumowanie.

Przedłożona do oceny rozprawa mgr Agaty Anny Cisek jest ciekawym, oryginalnym opracowaniem na temat archeonów metanogennych, ich detekcji, występowania i wpływu na zdrowie gospodarza. Problematyka badań przedstawionych w publikacjach oryginalnych została oparta o wnikliwą znajomość tematyki, popartej publikacją bardzo dobrej pracy przeglądowej. Tworzą one spójny tematycznie cykl artykułów naukowych, wnoszących nową wiedzę do dziedziny. Doktorantka wykazuje się dużą wiedzą i umiejętnością analizy danych literaturowych oraz umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników. Wymienione w recenzji uwagi i komentarze mają raczej charakter zaspokojenia ciekawości recenzenta i bynajmniej nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. Ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Agaty Anny Cisek do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu
Zakład Mikrobiologii
INSTYTUT IMMUNOLOGII
I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

Dr hab. Sabina Górska
Sabina Cisek
Kierownik Laboratorium
Immunobiologii Mikrobiomu

