

**Zakład Hematoonkologii
Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Lublin 20-090
ul. Chodzki 1
tel./fax. +48 81448 6630
Kierownik:
Prof. dr hab. Krzysztof
Giannopoulos**



**Experimental Hematooncology
Department
Medical University
of Lublin
20-090 Lublin, POLAND
1 Chodzki St.
tel./fax. +48 81448 6630
Head:
Prof. Krzysztof Giannopoulos**

Lublin, dn. 20.06.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

Lek. Martyna Tysza

**„Badanie zmian przepuszczalności bariery jelitowej po transplantacji krwiotwórczych
komórek macierzystych”**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Grzegorz W. Basak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Jarosław Biliński

Przeszczepianie allogenicznych komórek krwiotwórczych (allo-HCT) jest procedurą terapeutyczną o ugruntowanym znaczeniu w hematologii umożliwiającą wyleczenie wielu chorób o charakterze nowotworowym i nienowotworowym. Głównym ograniczeniem tej metody jest śmiertelność związana z procedurą, wynikająca przede wszystkim z powikłań infekcyjnych i ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGVHD). W ostatnich latach pojawiły się doniesienia na temat istotnej roli bariery jelitowej i jej zaburzeń w powstawaniu oraz progresji tych powikłań. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska podejmuje powyższą tematykę.

Publikacje wchodzące w skład cyklu przedstawionego w recenzowanej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu: łączny Impact Factor wyniósł 13.2, a całkowita liczba punktów MNiSW 350. We wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jej duże zaangażowanie w powstanie i publikację prac.

Oceniana rozprawa doktorska ma układ klasyczny. Praca liczy 78 stron wydruku komputerowego. Jej najważniejsze merytorycznie części to Streszczenia w języku polskim i angielskim (8 strony), Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl oraz komentujący osiągnięcia naukowe kandydata na tle dotychczasowego stanu wiedzy (12 stron), cykl reprintów 3 publikacji naukowych (32 strony), Podsumowanie (4 strony) i Wnioski (1 strona). Ponadto praca zawiera wykaz skrótów użytych w tekście (1 strona), bibliografię (5 stron) oraz załączniki w postaci zgody udzielonej przez Komisję Bioetyczną i oświadczeń współautorów publikacji (10 stron).

Streszczenia w języku polskim (strony 8-11) i języku angielskim (strony 12-15) pozwalają zapoznać się z założeniami pracy, uzyskanymi wynikami i wynikającymi z nich wnioskami. Są napisane w odpowiedni sposób pozwalając na uzyskanie podstawowego wglądu w najważniejsze tezy rozprawy. Streszczenie w języku angielskim zostało napisane stylistycznie poprawnie.

W rozdziale **Wstęp (strony 16-26)** został przedstawiony aktualny stan wiedzy na temat zagadnień związanych z tematem rozprawy. W tej części omówiono podstawowe informacje dotyczące procedury przeszczepiania allogenicznych komórek krwiotwórczych (w tym dane statystyczne, wskazania, zasady postępowania w okresie okołotransplantacyjnym) i choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Szerzej zostało omówione zagadnienie znaczenia bariery jelitowej u biorców allogenicznych komórek krwiotwórczych, jej wpływu na wyniki przeszczepiania i częstość występowania powikłań; przedstawiono zarówno aktualny stan wiedzy w tym zakresie, jak i wyniki badań zawartych w pracach tworzących cykl publikacji. Doktorantka przedstawiła także uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji.

Rozdział **Założenia i cel pracy (strony 26-27)** zawiera opis zamierzeń badań, których wyniki zostały przedstawione w cyklu publikacji. Wszystkie opisane cele zostały zrealizowane w opublikowanych pracach, co dowodzi umiejętności Doktoranta w zakresie planowania i realizacji badań.

Na **stronach 28-59** przedstawiono reprinty trzech prac wchodzących w skład cyklu publikacji. Każda z trzech prac wchodzących w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej spełnia wymogi dla recenzowanych publikacji naukowych. Pierwsza praca ma charakter poglądowy i przedstawia aktualny stan wiedzy na temat będący przedmiotem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Kolejne dwie prace o charakterze oryginalnym mają jasno określony cel badawczy oraz dokładnie opisane metody zastosowanych badań i analizy

statystycznej. Obie z tych prac przynoszą wnioski będące odpowiedzią na postawione cele badawcze i mające potencjalnie praktyczną wartość kliniczną.

W rozdziałach **Podsumowanie (strony 60-63)** oraz **Wnioski (strona 63)** przedstawiono i omówiono wyniki trzech opublikowanych prac stanowiących przedmiot rozprawy. Doktorantka skrótkowo poddała ocenie wyniki badań własnych oraz skrótkowo przedstawiła wypływające z nich wnioski. Pomimo ograniczonej objętości przedstawiony komentarz ma wysoką wartość merytoryczną, przedstawia ograniczenia omawianych badań, zawiera odniesienia do ich potencjalnego praktycznego znaczenia oraz wskazuje na dalsze kierunki badań w tym zakresie.

Praca pogładowa pt. **„Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting”** ukazała się w piśmie *Journal of Clinical Medicine* w 2021 roku (IF 4.9, punktacja MNiSW 140). Dokonano przeglądu dostępnej literatury dotyczącej bariery jelitowej, skupiając się na opisie struktury i funkcji prawidłowo funkcjonującej bariery jelitowej oraz dowodach na to, w jaki sposób jej uszkodzenie i zwiększona przepuszczalność jelit wpływają na wyniki leczenia chorych po allo-HCT. Omówiono metody oceny przepuszczalności jelitowej i opisano istniejące strategie terapeutyczne mające na celu ochronę bariery jelitowej, ze szczególnym uwzględnieniem zachowania i przywracania prawidłowego mikrobiomu jelitowego.

Pierwsza z prac oryginalnych wchodzących w skład recenzowanej rozprawy pt. **„Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and BetaDefensin-2 Concentrations in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients”** została opublikowana w piśmie *International Journal of Molecular Sciences* w 2022 roku (IF 5.6, punktacja MNiSW 140). Jej założeniem była ocena przepuszczalności bariery jelitowej i potencjalnych markerów jej uszkodzenia u 51 chorych poddawanych allo-HCT. W tym celu badano przepuszczalność jelitową wyrażoną jako stosunek laktulozy do mannitolu (LMR) w teście absorpcji cukrów (SAT) oraz oceniano stężenie zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 w kale w okresie okołotransplantacyjnym. Ograniczeniem badania była mała liczba pacjentów, od których uzyskano komplet próbek kału. U większości pacjentów wykazano nieprawidłową przepuszczalność bariery jelitowej już na 7 dni przed rozpoczęciem procedury przeszczepowej allo-HCT korelującą z wyższym wskaźnikiem występowania chorób towarzyszących. Po allo-HCT obserwowano dalszy wzrost przepuszczalności bariery jelitowej, wyraźniejszy u starszych chorych. Obserwowano tendencję do większego ryzyka powikłań bakteryjnych u pacjentów, u których wystąpił większy wzrost przepuszczalności

jelitowej. Nie stwierdzono natomiast korelacji między wynikami SAT a innymi markerami uszkodzenia bariery jelitowej, takimi jak zonulina, kalprotektyna i beta-defensyna-2. W przypadku chorych z aGVHD, obserwowano istotnie wyższe stężenie kalprotektyny w kale po allo-HCT w porównaniu z pacjentami bez tego powikłania. Według interpretacji autorów zwiększenie przepuszczalności jelitowej było prawdopodobnie spowodowane stosowaniem antybiotyków, chemioterapii lub naciekami białaczkowymi, ponadto uzyskane wyniki wskazywały na fakt, że uszkodzenie bariery jelitowej rozwija się już przed allo-HCT, nasila się w okresie potransplantacyjnym i poprzedza dalsze powikłania. Autorzy stwierdzili ponadto brak przydatności innych markerów uszkodzenia bariery jelitowej jako surogatów przepuszczalności jelitowej. Na uwagę zasługuje niewątpliwie innowacyjność powyższej publikacji, ponieważ stanowiła ona pierwszą dostępną w literaturze próbę oceny stężeń zonuliny i beta-defensyny-2 w kale u biorców allo-HCT.

Trzecia z publikacji wchodzących w skład recenzowanej rozprawy pt. **„Altered lipid metabolism in patients with acute graftversus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation”** jest pracą oryginalną i została opublikowana w piśmie *Leukemia Research* w 2024 roku (IF 2.7, punktacja MNiSW 100). Jej celem była ocena profili metabolicznych chorych po allo-HCT oraz porównanie powyższych profili pomiędzy pacjentami, u których w okresie poprzyszczepowym zdiagnozowano lub nie aGVHD. Za pomocą metod niecelowanej analizy metabolomicznej oceniono zmiany w metabolizmie lipidów, węglowodanów, aminokwasów, nukleotydów i metabolitów pochodzenia bakteryjnego w grupie 38 chorych. W grupie chorych z aGVHD wykazano deregulację profili metabolicznych występującą na 7 dni przed rozpoczęciem procedury allo-HCT, a także zidentyfikowano istotne zmiany w metabolizmie lipidów związanych ze szlakiem przekształcania kwasów żółciowych i syntezą cholesterolu. W interpretacji autorów powyższe wyniki mogły wynikać z zaburzenia składu mikrobiomu u pacjentów z aGVHD oraz wskazały na potencjalny związek między metabolizmem lipidów a etiopatogenezą i rozwojem aGVHD. Równocześnie autorzy wskazali także na ograniczenia badania, takie jak mała wielkość i homogenność grupy oraz występowanie czynników wpływających na metabolom tj. otyłość, dyslipidemia, cukrzyca czy stosowanie leków w okresie okołotransplantacyjnym. Świadczy to o umiejętności krytycznego interpretowania wyników i dostrzeżeniu konieczności dalszych badań w celu wyciągnięcia wiążących wniosków.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Od strony merytorycznej dysertacja zasługuje na duże uznanie i nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka

wykazała się dużą i aktualną wiedzą teoretyczną, a także umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań, analizy wyników i wyciągania wpływających z nich wniosków. Również od strony redakcyjnej praca została przygotowana poprawnie. W związku z tym trudno jest znaleźć jakiegokolwiek merytoryczne błędy i mam tylko jedną tego typu uwagę - w mojej ocenie zabrakło próby wy tłumaczenia braku związku zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej ocenianej przy pomocy SAT ze stężeniem markerów uszkodzenia bariery jelitowej. Ponadto we fragmencie opisującym pobranie krwiotwórczych komórek macierzystych padło stwierdzenie o ich pobieraniu w drodze leukaferazy w 4-5 dni od zakończenia podawania G-CSF, podczas gdy w rzeczywistości procedura ta jest wykonywana zwykle po 4-5 dniach od rozpoczęcia podawania G-CSF. Inne uwagi mają jedynie charakter redakcyjny. Moim zdaniem część wstępu poświęcona ogólnym informacjom na temat procedury przeszczepiania allogenicznych komórek krwiotwórczych, w tym danym statystycznym, wskazaniom, kwalifikacji, pobieraniu komórek i kondycjonowaniu, jest nieco zbyt obszerna w kontekście tematu dysertacji. Wydaje mi się, że powyższe informacje mogłyby być bardziej skrócone, natomiast jak najbardziej zasadne jest szersze opisanie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi i roli bariery jelitowej u biorców allo-HCT. W rozdziale Wstęp opisane zostały wyniki prac oryginalnych wchodzących w skład cyklu publikacji w połączeniu z opisem aktualnego stanu wiedzy na temat wpływ zaburzeń bariery jelitowej na wyniki allo-HCT. Dopiero w kolejnym rozdziale przedstawione zostały założenia i cel pracy, a wyniki zostały ponownie dokładniej opisane w rozdziale Podsumowanie. Moim zdaniem bardziej logiczne byłoby zupełne pominięcie opisu wyników w rozdziale Wstęp. W rozdziale Wnioski w ostatnim punkcie mowa o pacjentach, u których wystąpiła allo-HCT, podczas gdy chodzi o pacjentów z aGVHD, co jest oczywistym błędem redakcyjnym. W tekście występują także pojedyncze błędy literowe, np. w streszczeniu angielskim (str. 12) czy w rozdziale Wstęp (str. 17).

Powyższe uwagi nie umniejszają jednak wartości naukowej i jakości przedstawionej mi do recenzji dysertacji. Jej niewątpliwą ogromną zaletą jest innowacyjność przejawiająca się podjęciem badań dotychczas nie publikowanych, jak ocena stężenia zonuliny i beta-defensyny-2 w kale u biorców allo-HCT, lub przedstawianych w nielicznych publikacjach z udziałem małych grup pacjentów, jak ocena profili metabolicznych u pacjentów poddawanych allo-HCT. Dodatkowo przedstawione wyniki mogą być punktem wyjścia dalszych badań o znaczeniu praktycznym, np. nad możliwością zapobiegania dysregulacji mikrobiomu i metabolomu u biorców allo-HCT. O wysokiej jakości merytorycznej dysertacji

świadczy także uzyskanie na przeprowadzenie badań finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM.

Dlatego podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Martyny Tyszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Norbert Grząsko

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie