

**Katedra i Klinika Hematologii, Terapii
Komórkowych i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu
51-537 Wrocław, Aleja L. Pasteura 4**

Wrocław, 30.10.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Martyny Tyszk
"Badanie zmian przepuszczalności bariery jelitowej po
transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych."**

Transplantacja, inaczej przeszczepienie allogenicznych komórek krwiotwórczych (ang. allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; alloHSCT) to metoda terapeutyczna stosowana w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego, układu chłonnego, a także wybranych chorób autoimmunologicznych. AlloHSCT stosuje się u chorych, których rokowanie co do wyleczenia i przeżycia jest istotnie gorsze w przypadku zastosowania innych rodzajów terapii lub u tych, których wyleczenie nie jest możliwe innymi metodami. Mimo znacznego rozwoju metod transplantacyjnych na przestrzeni ostatnich czterech dekad, istotnym ograniczeniem alloHSCT pozostaje śmiertelność nie związana z nawrotem (ang. non-relapse mortality; NRM), której główną przyczyną jest choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi (ang. graft-versus-host disease; GvHD). Obecnie u dorosłych chorych rutynowo wykonywane są przeszczepienia od rodzeństwa zgodnego w zakresie antygenów układu HLA, od dawców rodzinnych zgodnych w jednym haplocyocie oraz od dawców niespokrewnionych w pełni lub częściowo zgodnych w zakresie antygenów HLA (tj. od dawców zgodnych w 10/10 lub 9/10 antygenów HLA). Pomimo coraz precyzyjniejszych metod oznaczania antygenów HLA i ich alleli, ostra (ang. acute; a) i przewlekła (ang. chronic; c) GvHD pozostają nadal istotnym problemem klinicznym wpływającym na utrzymywanie się NRM powyżej 10-15% w czasie pierwszych 2 lat po alloHSCT. W patogenezie aGvHD rola uszkodzenia bariery jelitowej jest dobrze poznana, jednak identyfikacja chorych szczególnie narażonych na takie uszkodzenie oraz tych, u których uszkodzenie bariery doprowadzi do rozwoju ciężkiej postaci aGvHD pozostaje ważnym do rozwiązania problemem klinicznym. Z

tych względów wybór tematu uważam za właściwy zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia, zwłaszcza dla lekarza naukowca.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. med. Martyny Tyszkowej jest pracą kliniczną dobrze wpisującą się w to trudne i istotne klinicznie zagadnienie.

Podejście tematyczne, założone cele i zastosowana metodologia wskazują na opanowanie przez Autorkę warsztatu naukowego oraz na przejęcie doświadczeń promotora i promotora pomocniczego. Dodatkowo pragnę dodać, że Klinika, w której rozprawa została przeprowadzona to jednostka o wybitnym doświadczeniu w zakresie badań nad uszkodzeniem bariery jelitowej i znaczeniem zaburzeń mikrobiomu u chorych poddawanych transplantacji komórek krwiotwórczych. Wybór grupy badanej oraz metod badawczych należy uznać za właściwy i umożliwiający osiągnięcie przez Autorkę oczekiwanych wyników.

Na przedstawione mi do oceny osiągnięcie naukowe składają się dwie prace oryginalne oraz jedna pogładowa, opublikowane w periodykach o wysokim współczynniku oddziaływania (sumarycznie IF wynoszący ponad 13). Omówienie osiągnięcia zawiera 27 stron maszynopisu, po którym załączono publikacje stanowiące cykl, a po nich umieszczono 4 stronicowe Podsumowanie, następnie Wnioski oraz Piśmiennictwo zawierające 53 cytowane pozycje piśmiennictwa angielskojęzycznego. Dodatkowo tekst pracy poprzedzony jest stroną tytułową, spisem treści, wykazem publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, wykazem użytych skrótów oraz załączonymi streszczeniami w języku polskim i angielskim. Na końcu pracy dołączono załączniki zawierające: opinię komisji bioetycznej oraz oświadczenia współautorów i Doktorantki dotyczące jej wkładu merytorycznego w powstanie opublikowanych prac.

W treściwym wstępie obejmującym 10 stron, Autorka omówiła wskazania do transplantacji komórek krwiotwórczych, statystyki przeszczepień w Polsce, przebieg procedury transplantacyjnej oraz główne powikłanie alloHSCT, którym jest choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi. Autorka przedstawiła również skrótowo informacje dotyczące budowy i funkcji bariery jelitowej oraz mikrobiomu jelitowego oraz opisała aktualny stan wiedzy na temat wpływu uszkodzenia bariery jelitowej na powikłania po alloHSCT, dodatkowo przedstawiając wyniki badań prowadzonych w Klinice Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych UCK WUM i zawartych w cyklu publikacji. W tej części Autorka uzasadniła wybór badanych biomarkerów uszkodzenia nabłonka jelit oraz zastosowanie analizy metabolomicznej dla identyfikacji nowych osoczowych biomarkerów

aGvHD, w oparciu o aktualny stan wiedzy na ten temat. Ostatecznie Autorka przedstawiła główny cel pracy, którym była było dogłębne zbadanie zmian zachodzących na poziomie bariery jelitowej u chorych w okresie okołoprzeszczepowym oraz próba wyznaczenia potencjalnego markera pozwalającego na identyfikację chorych ze znacznymi zaburzeniami bariery jelitowej, szczególnie zagrożonych wystąpieniem aGVHD. Doktorantka dodatkowo precyzuje cele szczegółowe doktoratu wynikające z poszczególnych prac będących osiągnięciem naukowym:

1) w pierwszej z prac oryginalnych celem była ocena przepuszczalności bariery jelitowej za pomocą testu absorpcji cukrów (SAT) u chorych poddanych alloHSCT, analiza związku między przepuszczalnością bariery jelitowej, a czynnikami zależnymi od chorego oraz od przeszczepienia, analiza związku między przepuszczalnością bariery, a wystąpieniem powikłań w okresie poprzyszczepowym (aGVHD, powikłania infekcyjne, zapalenie śluzówek), ocena uszkodzenia bariery jelitowej za pomocą analizy stężenia biomarkerów w kale (zonulina, kalprotektyna, beta-defensyna-2), analiza przydatności oceny markerów uszkodzenia bariery jelitowej jako surogatów przepuszczalności bariery jelitowej, analiza związku między stężeniem markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale, a czynnikami zależnymi od chorego oraz od przeszczepienia oraz wreszcie analiza związku między zawartością markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale, a wystąpieniem powikłań w okresie poprzyszczepowym.

2) w drugiej pracy oryginalnej celem była ocena profili metabolicznych chorych w okresie okołotransplantacyjnym oraz porównanie profili metabolicznych chorych, u których wystąpiła aGVHD z pozostałymi pacjentami

3) celem pracy poglądowej był opis stanu wiedzy na temat struktury i funkcjonowania bariery jelitowej oraz dokonanie przeglądu dostępnej literatury na temat wpływu uszkodzenia tej bariery i zwiększonej przepuszczalności jelit na wyniki alloHSCT wraz z omówieniem metod oceny przepuszczalności jelitowej i strategii terapeutycznych mających na celu ochronę bariery jelitowej

Cele pracy zostały precyzyjnie dobrane, są zrozumiałe i uzasadniają podjęcie badań.

Materiał, metody i wyniki prac oryginalnych omówione zostały przez Doktorantkę częściowo w podrozdziale 5.3.2 Wstępu „Wpływ zaburzeń bariery jelitowej na wyniki alloHSCT - opis stanu wiedzy oraz wyników badań zawartych w cyklu publikacji” oraz w Rozdziale 8 „Podsumowanie”.

W pierwszej pracy oryginalnej z cyklu pt. „Increased Intestinal Permeability and Stool

Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients” przeprowadzono analizę przepuszczalności jelit za pomocą SAT oraz ocenę stężeń markerów uszkodzenia bariery jelitowej, tj. zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 w kale u 51 pacjentów w okresie okołoprzeszczepowym. U większości pacjentów poddawanych alloHSCT wykazano zwiększoną przepuszczalność jelit mierzoną stosunkiem laktulozy do mannitolu w teście absorpcji cukrów (SAT) już przed rozpoczęciem terapii kondycjonującej. Zaobserwowano istotny związek między podwyższonym LMR przed alloHSCT a wysokim HCT-CI. Nie wykazano korelacji między wynikami SAT a innymi markerami uszkodzenia bariery jelitowej (zonulina, kalprotektyna i beta-defensyna-2). Stwierdzono natomiast, że stężenie zonuliny w kale było podwyższone już przed rozpoczęciem kondycjonowania u większości pacjentów (88%) i istotnie spadało w dniu +7 po allo-HCT. Autorzy wnioskują, że zwiększenie przepuszczalności jelitowej u chorych leczonych alloHSCT jest prawdopodobnie spowodowane stosowaniem antybiotyków, uszkodzeniem jelit w wyniku chemioterapii cytotoksycznej lub naciekami białaczkowymi.

W drugiej pracy oryginalnej “Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation” oceniano profile metaboliczne u chorych po allo-HCT, u których w okresie poprzyszczepowym zdiagnozowano aGvHD i porównywano z profilami pacjentów, u których nie rozwinęło się to powikłanie. Za pomocą metod niecelowanej analizy metabolomicznej oceniono globalne zmiany w metabolizmie aminokwasów, węglowodanów, lipidów, nukleotydów, a także metabolitów pochodzenia bakteryjnego. Do badania włączono 38 chorych, spośród których u 15 wystąpiła aGvHD. U chorych, u których rozwinęła się aGvHD wykazano deregulację profili metabolicznych, która była widoczna już 7 dni przed rozpoczęciem procedury alloHSCT. W tej grupie chorych zidentyfikowano istotne zmiany w metabolizmie lipidów związanych ze szlakiem przekształcania kwasów żółciowych i syntezą cholesterolu. Wyniki badania wykazały potencjalny związek między metabolizmem lipidów, szczególnie szlakami transformacji kwasów żółciowych i syntezy cholesterolu oraz etiopatogenezą aGvHD. Doktorantka umiejętnie omówiła ograniczenia badania, tj. małą wielkość i brak homogenności badanych grup oraz wiele niekontrolowanych czynników potencjalnie wpływających na metabolom tj. obecność otyłości, dyslipidemii, cukrzycy oraz stosowanie antybiotyków i leków immunosupresyjnych w okresie okołotransplantacyjnym. Podkreśliła, że nie jest pewne, czy wyniki odzwierciedlają wpływ allo-HCT na profil metaboliczny, czy raczej charakteryzują populację biorców alloHSCT ze zwiększonym ryzykiem rozwoju aGvHD.

W rozdziale Podsumowanie, który jest po części Dyskusją, Doktorantka omawia uzyskane wyniki własne porównując je z innymi opublikowanymi badaniami na świecie, jednocześnie podkreślając odrębności i ograniczenia własnej pracy.

Wnioski sformułowane przez Autorkę (rozdział 9) są zwięzłe, odpowiadają celom pracy i są uprawnione uzyskanymi wynikami własnych badań:

1. Przepuszczalność bariery jelitowej jest zwiększona u chorych poddawanych alloHSCT już w okresie przedtransplantacyjnym i ulega dalszemu zwiększeniu po alloHSCT.
2. Zwiększenie przepuszczalności bariery jelitowej wyrażonej jako LMR w moczu przed allo-HCT było istotnie większe u chorych ze współistniejącymi chorobami przewlekłymi (HCT-CI >2).
3. Stężenie markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale nie koreluje z przepuszczalnością bariery jelitowej ocenianą przy pomocy SAT i wyrażoną jako LMR.
4. Podwyższone stężenie kalprotektyny w kale w dniu +7 po alloHSCT jest potencjalnym czynnikiem ryzyka/wskaźnikiem wystąpienia aGvHD.
5. Chory, którzy rozwijają aGvHD po alloHSCT mają odmienne profile metaboliczne od chorych bez tego powikłania.
6. Metabolity istotnie odróżniające chorych, u których wystąpiła aGvHD to metabolity szlaku kwasów żółciowych w dniach -7, +7, +21 oraz metabolity syntezy cholesterolu w dniu +21.

W mojej ocenie sformułowane na podstawie wyników badań wnioski numer 4 i 5 stanowią podstawę do kontynuacji badań wieloośrodkowych w celu zgromadzenia większych i bardziej homogenicznych grup badanych. Nie wnoszę uwag krytycznych co do zasadności podejmowanych badań, toku ich przeprowadzenia, doboru metod badawczych, wyników oraz ich opracowania, interpretacji i dyskusji oraz wniosków końcowych. Pragnę podkreślić nie tylko walory metodologiczne pracy, ale także jej nowatorstwo.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę, że lekturę utrudniała nieco struktura omówienia cyklu prac. W mojej opinii brakuje rozdziału „Materiał i Metody”, a zwłaszcza rozdziału „Wyniki”, w którym Doktorantka sukcesywnie przedstawiłaby 3 prace będące składowymi prezentowanego osiągnięcia naukowego. Grupy badane, metody i wyniki prac Autorki przedstawione są częściowo w rozdziale 5 „Wstęp” i częściowo w rozdziale 8 „Podsumowanie”. Podsumowanie stanowi również po części Dyskusję. Ponadto w mojej opinii dyskusja dotycząca uzyskanych wyników badania metabolomu ze względu na znaczenie problemu omawianego przez Doktorantkę powinna być nieco dłuższa, a własne wyniki porównane z wynikami innych Autorów.

Dodatkowo z obowiązku Recenzenta muszę zwrócić uwagę na drobne błędy redakcyjne, których nie udało się uniknąć Autorce. Wykaz skrótów nie jest ułożony alfabetycznie, co utrudnia korzystanie z niego. Dodatkowo w skrócie LMR (lactulose to mannitol ratio) znalazł się błąd (podano LRM zamiast LMR). Format cytowanych pozycji piśmiennictwa nie jest jednolity, Autorka stosuje przynajmniej trzy różne wersje formatów (brak konsekwencji w liczbie wymienianych autorów prac, przedstawiania roczników i tomów czasopism itd.) Te drobne błędy nie zmniejszają oczywiście w żaden sposób wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko. .

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została dobrze zaplanowana i wykonana przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Drobne uwagi recenzenta nie umniejszają wartości tej pracy.

Pragnę dodać, że we wszystkich pracach cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem, a cykl prac jest spójny tematycznie. Rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienia pracy ze względu na jej nowatorski charakter, a także dużą wartość poznawczą i praktyczną oraz nowoczesne metody badawcze.

Z wyżej wskazanych względów stwierdzam, że przesłana mi do oceny Rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. **Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.).**

Mam zaszczyt i przyjemność wystąpić do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Martyny Tyszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego z jednoczesnym wnioskiem o wyróżnienie pracy, co uzasadniłam powyżej.

Anna Czyż
prof. dr hab. n. med.