



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Recenzja doktoratu lek. Alberta Michała Stec

Kraków dn.22.09.2023

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska lek. Alberta Michała Stec „Rola zaburzeń bariery jelitowej i metabolitów bakteryjnych w twardzinie układowej-implikacje kliniczne i terapeutyczne „, powstała pod opieką Pani Promotor

Prof. dr hab. n. med. Lidii Rudnickiej porusza aktualny, szeroko badany w różnych schorzeniach wpływ zaburzeń flory bakteryjnej jelit, zaburzeń wchłaniania z przewodu pokarmowego na rozwój wielu schorzeń, w tym także schorzeń dermatologicznych takich jak łuszczyca, atopowe zapalenie skóry, trądzik czy liszaj rumieniowaty. Rolę dysbiozy czyli zaburzeń składu mikrobioty jelitowej na występowanie i przebieg chorób dermatologicznych tłumaczy teoria osi jelito-skóra, zgodnie z którą zmieniona flora bakteryjna jelita może wpływać na te schorzenia poprzez uwalnianie szkodliwych dla organizmu substancji- metabolitów. Dodatkowe uszkodzenie bariery jelitowej i co za tym idzie zwiększenie przepuszczalności jelit sprzyja przemieszczaniu metabolitów, antygenów do krwiobiegu, które stymulując układ immunologiczny mogą prowadzić do rozwoju i zaostrzenia objawów dermatozy. Poszukując czynników patogenetycznych chorób autoimmunologicznych, których etiopatogeneza jest ciągle badana i nie do końca poznana także ten mechanizm powstawania i rozwoju choroby jest badany.

Twardzina układowa jest systemową autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej, często o ciężkim wielonarządowym przebiegu, której patogeneza nie jest w pełni poznana- jest zatem dobrym modelem do takich badań. Zmiany narządowe w twardzinie układowej dotyczą najczęściej zaburzeń motoryki przełyku, czasem przebiegające ostro z wymiotami, także niebezpiecznym dla życia zahamowaniem perystaltyki jelit, śródmiąższowej choroby płuc, nadciśnieniem płucnym czy niewydolnością serca z włóknieniem mięśnia sercowego. Zaplanowanie badań w chorobie, którą od wielu lat zajmujesz naukowo i klinicznie Pani Profesor Lidia Rudnicka potwierdza doskonałą znajomość „luki” badawczej którą Mentorka i Twórczyni projektu wraz ze swoim Podopiecznym wypełnia. Dysertacja doktorska lek. Alberta Michała Stec opiera się na cyklu powiązanych tematycznie 3 publikacji, które zostały już

zrecenzowane i przyjęte do druku. We wszystkich publikacjach lek. Albert Michał Stec jest pierwszym autorem. Praca otrzymała dofinansowanie w ramach projektu „TIME 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014-2020 nr umowy



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

POWR.03.05.00-00-Z040/18-00. Doktorant otrzymał zgodę Komisji Bioetycznej WUM na prowadzenie badań.

Hipoteza badawcza dla cyklu 2 prac oryginalnych Doktoranta, oparta na dokładnej analizie bardzo wielu wcześniejszych publikacji i badań klinicznych przedstawionych w 1 obszernej pracy przeglądowej zakłada, że szkodliwe metabolity bakterii jelitowych i inne substancje łatwiej przechodzące przez uszkodzoną, o zwiększonej przepuszczalności ścianę jelit, mogą nasilać procesy włóknienia uwrażliwiając fibroblasty na działanie czynników profibrotycznych.

Celem cyklu prac było:

1. Określenie potencjalnych nieprawidłowości w stężeniu metabolitu dysbiotycznej mikrobioty jelitowej – N-tlenku trimetyloaminy (ang. trimethylamine N-oxide; TMAO) w twardzinie układowej oraz potencjalnego związku z wystąpieniem typowych objawów narządowych choroby.
2. Ocena stanu bariery jelitowej w twardzinie układowej i określenie związku stężenia markerów przepuszczalności jelit z aktywnością i objawami choroby, w tym w szczególności z występowaniem śródmiąższowej choroby płuc oraz zaburzeniami motoryki przełyku.
3. Analiza potencjalnych różnic w stężeniu markerów przepuszczalności jelit u pacjentów z różnym czasem trwania twardziny układowej.

W publikacji pierwszej

1. Stec, A.; Sikora, M.; Paraleusz-Stec, K.; Michalska, M.; Siorska, E.; Rudnicka, L. Bacterial Metabolites: a Link between Gut Microbiota and Dermatological Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3494. - przedstawiono podsumowanie dotychczasowych doniesień dotyczących roli poszczególnych badanych grup metabolitów mikrobioty jelitowej

w jednostkach dermatologicznych w szczególności o podłożu autoimmunologicznym. Autorzy cytowali publikacje opisujące potwierdzoną rolę, takich metabolitów jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe działających przeciwzapalnie i immunomodulująco, pochodnych tryptofanu, których zaburzenia w patogenezie twardziny były wielokrotnie podkreślane oraz monoaminy- N-tlenek trimetylaminy

(TMAO) i trimetyloamina (TMA). Podkreślono wyniki badań wskazujące na negatywny wpływ N-tlenku trimetyloaminy na przebieg HS, toczenia rumieniowatego oraz twardziny



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

układowej. W pracy Autorzy zwrócili także uwagę na dostępne metody modyfikacji mikrobioty jelitowej poprzez podaż probiotyków, prebiotyków, postbiotyków oraz zastosowanie metody "przeszczepu mikrobioty jelitowej". W podsumowaniu Autorzy przeglądu sugerują, że metabolity indolu i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wykazują korzystne działanie przeciwzapalne i immunomodulujące w chorobach dermatologicznych natomiast pochodne amin, zwłaszcza TMAO, mogą przyspieszać postęp choroby dermatologicznej poprzez swoje działanie prozapalne.

2. Stec A, Maciejowska M, Paralusz-Stec K, Michalska M, Giebułtowicz J, Rudnicka L, Sikora M. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide is Linked to Specific Complications of Systemic Sclerosis. *Journal of Inflammation Research* 2023;16:185-1904. –celem tego badania była ocena stężenia bakteryjnego metabolitu N-tlenku trimetyloaminy w osoczu pacjentów z SSc oraz zbadanie korelacji pomiędzy stężeniem TMAO a parametrami klinicznymi choroby: wiek, płeć, podtyp choroby oraz zajęciem narządów: płuc, przewodu pokarmowego, serca.

Do badania włączono 63 pacjentów z twardziną układową i 47 zgodnych pod względem wieku, płci i BMI ochotników. Stężenie TMAO w surowicy zbadano z użyciem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Wyniki opracowano z zastosowaniem programu Statistica 13.3, użyto także takie narzędzia statystyczne jak test Shapiro-Wilka, test chi-kwadrat, test t-Studenta, test Whitney, a, współczynnik korelacji rang Spermmana. Stwierdzono: 1. Pacjenci z SSc mieli istotnie statystycznie wyższe stężenie TMAO w surowicy. 2. Wykazano, że pacjenci z SSc i śródmiąższową chorobą płuc mieli istotnie wyższe stężenie TMAO w osoczu versus ci chorzy z SSc którzy nie mieli śródmiąższowej choroby płuc 3. Także chorzy z SSc i zaburzeniami motoryki przełyku mieli istotnie wyższe stężenia TMAO w osoczu versus chorzy bez zaburzeń motoryki przełyku. Także chorzy z niską frakcją wyrzutową lewej komory mieli wyższy poziom tej aminy w osoczu.

Zdaniem Autorów wyniki badań mogą świadczyć o potencjalnej roli mikrobioty jelitowej i jej metabolitów (badano tylko TMAO!) w wystąpieniu objawów narządowych w SSc

3. Stec, A; Maciejowska, M; Zaremba, M; Paralusz-Stec, K; Michalska, M; Rudnicka, L; Sikora, M. The clinical Significance of Serum Biomarkers of the Intestinal barrier in Systemic Sclerosis: a Cross-Sectional Study. *J. Pers. Med.* 2023, 13, 676.

W pracy oceniono stężenie wybranych markerów przepuszczalności jelitowej: jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe (I-FABP), Klaudyny-3 i lipopolisacharydów bakteryjnych (LPS) w surowicy 50 pacjentów z twardziną układową i 30 ochotników z grupy kontrolnej. Stężenia markerów oznaczano metodą testu immunoenzymatycznego.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wykazano, że : 1. Pacjenci z SSC mieli istotnie wyższe stężenie LPS w surowicy versus grupa kontrolna. 2. Dodatkowo pacjenci z SSC i krótszym czasem trwania choroby mieli istotnie wyższe stężenie LPS i Klaudyny w surowicy versus pacjenci z SSC i dłuższym niż 6 lat czasem trwania choroby. U pacjentów z SSC i krócej trwającą chorobą stwierdzono wyższe stężenia LPS w surowicy gdy wykazano u nich dodatkowo śródmiąższowe zapalne zmiany w płucach versus podgrupa z SSC bez zmian w płucach. 3. Chorzy z zaburzeniami motoryki przełyku potwierdzonymi w badaniu kontrastowym mieli niższy poziom LPS w surowicy versus pacjenci z SSC i prawidłową motoryką.

Na podstawie wyników wykonanych badań Doktorant sformułował 4 wnioski:

1. Stężenie metabolitu mikroby jelitowej- N-tlenku trimetyloaminy w surowicy jest istotnie wyższe u pacjentów z twardziną układową w porównaniu do grupy kontrolnej. Występowanie niektórych objawów choroby, m.in. śródmiąższowej choroby płuc oraz zaburzeń motoryki przełyku, wiąże się ze szczególnie podwyższonym stężeniem TMAO.

2. Metabolity mikroby jelitowej mogą być łącznikiem między dysbiozą jelitową i zajęciem narządów w przebiegu twardziny układowej. Modulacja metabolitów pochodzących z bakterii jelitowych może stanowić nowe podejście terapeutyczne w leczeniu twardziny układowej.

3. Stężenie markera przepuszczalności jelitowej- lipopolisacharydów w surowicy jest istotnie wyższe u pacjentów z twardziną układową w porównaniu do grupy kontrolnej; podgrupa pacjentów o krótszym czasie trwania choroby (czas mniejszy lub równy 6 lat) charakteryzuje się istotnie statystycznie większym stężeniem markerów przepuszczalności jelitowej, LPS i kładyny-3 w porównaniu do podgrup o dłuższym czasie trwania choroby (powyżej 6 lat), co sugeruje występowaniem zwiększonej przepuszczalności jelit na wczesnym etapie choroby.

4. Niższe stężenie markerów przepuszczalności jelitowej (LPS i Klaudyny-3) u pacjentów z dłuższym okresem trwania choroby (powyżej 6 lat) w porównaniu do chorych o krótszym przebiegu choroby może być spowodowane współwystępującymi zaburzeniami wchłaniania wynikającymi z zajęcia przewodu pokarmowego.

Reasumując, temat badań Doktoranta jest zgodny z profilem aktualnie prowadzonych badań nad czynnikami etiopatogenetycznymi w schorzeniach autoimmunologicznych, publikacje zostały przyjęte do druku w czasopiśmie angielskojęzycznym, całkowity IF 3 publikacji lek. Alberta Michała Stec jest wysoki i wynosi 14,347, piśmiennictwo jest obszerne we wszystkich publikacjach i właściwie dobrane. Wnioski są sformułowane prawidłowo i interpretacja wyników jest wyważona. Opracowanie w języku polskim



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

przygotowane zgodnie z wymogami dla dysertacji doktorskich odpowiada treści prac opublikowanych.

Dodatkowej interpretacji wymaga wynik, dlaczego w podgrupie pacjentów z krótszym czasem trwania choroby (do 6 lat) stwierdzono istotnie wyższe stężenie LPS w surowicy w grupie chorych z SSc zwłaszcza u chorych z zajęciem płuc a z drugiej strony pacjenci z zaburzeniami motoryki przełyku potwierdzonymi w badaniu kontrastowym (z kontrastem z barem) mieli niższy poziom LPS w surowicy- czy zaburzenie motoryki przełyku (najczęściej spowolnienie) nie wpłynęło na wchłanianie? Czy ocena motoryki przełyku, wykonywana standardowo u naszych chorych z SSC, pozwala na wysuwanie wniosków o stanie całego przewodu pokarmowego, a zwłaszcza o wchłanianiu substancji z przewodu pokarmowego- ten proces odbywa się w jelitach- jest to pytanie otwarte?

Sugerowałabym także w przyszłości do oceny motoryki przełyku używać czulszych testów diagnostycznych ph-metrycznych, scyntygraficznych, które ocenią bardziej obiektywnie nasilenie zmian przełykowych. Jeszcze bardziej wartościowe byłoby porównanie stężeń wytypowanych przez Doktoranta parametrów w surowicy pacjentów z oceną stanu klinicznego/ badaniem całego przewodu pokarmowego. Wielu pacjentów z SSc ma niewielkie zmiany motoryki przełyku a ogromne zmiany w jelicie demonstrując objawy „ostrego brzucha”: bólu brzucha, zahamowanie, spowolnienia perystaltyki także chłustające wymioty.

Także stosowane leczenie i to nie tylko rodzaj i czas terapii ale dawki leków mogą zmieniać badane parametry –co wymaga zapewne dalszej interpretacji badań. Powyższe uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej oceny całego cyklu prac - pozwalają sądzić, że rozpoczęte przez Doktoranta badania będą kontynuowane.

Na podstawie powyżej przedstawionych danych, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lekarz medycyny Alberta Michała Stec przygotowana pod opieką promotorską Prof. dr hab. med. Lidii Rudnickiej spełnia warunki określone przepisami art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Mam więc zaszczyt przedłożyć Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej wraz z wnioskiem o dopuszczenie lekarz medycyny Alberta Michała Stec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.