

---

**Lek. Martyna Tyszka**

**Badanie zmian przepuszczalności bariery jelitowej po  
transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych.**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz W. Basak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Jarosław Biliński

Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersyteckie Centrum  
Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024 r.

---

**Słowa kluczowe:**

**Bariera jelitowa, Przepuszczalność jelit, Mikrobiota jelitowa, Metabolomika, allo-HCT,  
aGVHD**

**Keywords:**

**Intestinal Barrier, Intestinal Permeability, Intestinal Microbiota, Metabolomics, allo-  
HCT, aGVHD**

---

Serdecznie dziękuję Promotorowi, Panu Profesorowi Grzegorzowi Basakowi za cierpliwość, motywację i dobre warunki do pracy naukowej oraz wsparcie merytoryczne.

Dziękuję Promotorowi Pomocniczemu, Panu Doktorowi Jarosławowi Bilińskiemu oraz współautorce prac, Pani Doktor Dominice Maciejewskiej-Markiewicz za inspirację do pracy naukowej i pomoc w realizacji pracy doktorskiej.

Dziękuję pracownikom Dziekanatu Studiów Doktoranckich, przede wszystkim pani Justynie

Dzwonkowskiej za cierpliwość i udzielane wsparcie podczas studiów doktoranckich

Serdecznie dziękuję rodzinie, przede wszystkim mojemu mężowi Krzysztofowi Tyszcze za wsparcie i wyrozumiałość oraz motywację do pracy naukowej.

---

**Rozprawa doktorska dotyczy projektu badawczego nr 2018/29/N/NZ5/01779  
finansowanego w ramach konkursu PRELUDIUM 15  
Narodowego Centrum Nauki**

---

## Spis treści

|  |    |
|--|----|
| 1. Wykaz publikacji .....  | 6  |
| 2. Wykaz stosowanych skrótów .....   | 7  |
| 3. Streszczenie w języku polskim .....   | 8  |
| 4. Streszczenie w języku angielskim (wraz z angielską wersją tytułu rozprawy).....   | 12 |
| 5. Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl, jak i komentujący osiągnięcie naukowe kandydata na tle dotychczasowego stanu wiedzy..... | 16 |
| 5.1    Procedura przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych.....  | 16 |
| 5.1.1    Wprowadzenie.....   | 16 |
| 5.1.2    Dane statystyczne i wskazania .....   | 16 |
| 5.1.3    allo-HCT – zasady postępowania.....   | 17 |
| 5.2    Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi .....   | 19 |
| 5.3    Rola bariery jelitowej u biorców allo-HCT .....   | 20 |
| 5.3.1    Bariera jelitowa .....  | 20 |
| 5.3.2    Wpływ zaburzeń bariery jelitowej na wyniki allo-HCT - opis stanu wiedzy oraz wyników badań zawartych w cyklu publikacji.....                          | 21 |
| 5.3.3    Uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji.....   | 25 |
| 6. Założenia i cel pracy .....   | 26 |
| 7. Kopie opublikowanych prac .....   | 28 |
| 7.1    Publikacja 1 .....  | 28 |
| 7.2    Publikacja 2 .....  | 39 |
| 7.3    Publikacja 3 .....  | 52 |
| 8. Podsumowanie .....  | 60 |
| 9. Wnioski .....   | 63 |
| 10. Piśmiennictwo.....   | 64 |
| 11. Opinia Komisji Bioetycznej.....  | 69 |
| 12. Oświadczenia współautorów .....  | 71 |

---

## 1. Wykaz publikacji

[1] Tyszka M, Biliński J, Basak GW. Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting. *J Clin Med.* 2021;10:2508.

**IF 4,9, MNiSW 140 pkt**

[2] Tyszka M, Maciejewska-Markiewicz D, Biliński J, Lubas A, Stachowska E, Basak GW. Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. *Int J Mol Sci.* 2022;23:15962.

**IF 5,6, MNiSW 140 pkt**

[3] Tyszka M, Maciejewska-Markiewicz D, Styburski D, Biliński J, Tomaszewska A, Stachowska E, Basak GW. Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leuk Res.* 2024;137:107435

**IF 2.7, MNiSW 70 pkt**

**Sumaryczny IF: 13,2**

**Łączna ilość punktów MNiSW 350**

---

## 2. Wykaz stosowanych skrótów

| Skrót         | Rozwinięcie w j. angielskim                                   | Rozwinięcie w j. polski  |
|---------------|---|--|
| HCT           | hematopoietic cell transplantation                            | przeszczepienie komórek krwiotwórczych   |
| allo-HCT      | allogeneic hematopoietic cell transplantation                 | przeszczepienie allogenicznych komórek krwiotwórczych                                  |
| GVHD          | graft versus host disease                                     | choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi  |
| aGVHD         | acute graft versus host disease                               | ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi                                 |
| SAT           | sugar absorption test   | test absorpcji cukrów  |
| LC-MS         | liquid chromatography-mass spectrometry                       | chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas                                 |
| GC-MS         | gas chromatography-mass spectrometry                          | chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas                                   |
| NMR           | nuclear magnetic resonance                                    | jądrowy rezonans magnetyczny   |
| LRM           | lactulose to mannitol ratio                                   | stosunek laktulozy do mannitolu  |
| HCT-CI        | hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index | wskaźnik występowania chorób towarzyszących dla przeszczepienia komórek krwiotwórczych |
| CMV           | Cytomegalovirus   | cytomegalowirus  |
| EBV           | Epstein-Barr virus  | wirus Epsteina-Barr  |
| HLA           | human leukocyte antigen                                       | antygen zgodności tkankowej  |
| G-CSF         | granulocyte-colony stimulating factor                         | czynnik wzrostu kolonii granulocytów   |
| RIC           | reduced intensity conditioning                                | kondycjonowanie o zredukowanej intensywności   |
| cGVHD         | chronic graft versus host disease                             | przewlekła postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi                            |
| MAGIC         | The Mount Sinai Acute GVHD International Consortium           | Międzynarodowe Konsorcjum Mount Sinai Acute GVHD                                       |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor alfa                                    | czynnik martwicy nowotworów alfa   |
| SCFAs         | short chain fatty acids                                       | krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe  |
| PAMPs         | pathogen-associated molecular patterns                        | wzorce molekularne związane z patogenami   |
| WHO           | World Health Organisation                                     | Światowa Organizacji Zdrowia   |
| 51CrEDTA      | Chromium-51 ethylenediamine tetra-acetic acid                 | kwask wersenowy znakowany chromem 51   |
| ZOT           | zonula occludens toxin  | toksyna zonula occludens   |

---

### 3. Streszczenie w języku polskim

Przeszczepianie allogenicznych komórek krwiotwórczych (ang. allogeneic hematopoietic cell transplantation, allo-HCT) często jest jedyną procedurą umożliwiającą wyleczenie chorych na różne choroby onkohematologiczne oraz nienowotworowe. Jednym z głównych ograniczeń stosowania tej metody jest wysoka śmiertelność związana z procedurą, głównie w wyniku wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. graft versus host disease, GVHD) szczególnie ostrej postaci (ang. acute GVHD, aGVHD) i powikłań infekcyjnych. W ostatnich dwóch dekadach zagadnienie bariery jelitowej zyskało coraz większe zainteresowanie jako miejsce inicjacji i propagacji tych powikłań.

Bariera jelitowa to złożona struktura składająca się z warstwy komórek nabłonka pokrytych śluzem zamieszkanym przez mikroorganizmy, m.in. bakterie, wirusy i grzyby łącznie nazywane mikrobiomem jelitowym lub mikrobiotą jelitową. Nienaruszona bariera jelitowa zapobiega przenikaniu bakterii i toksyn z przewodu pokarmowego do ustroju. Z drugiej strony, przepuszczalność jelit umożliwia wchłanianie niezbędnych składników odżywczych, transport wody i elektrolitów. Do tej pory brakuje jednak metod oceny stanu bariery jelitowej mogących znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej. Metodą referencyjną stosowaną do analizy przepuszczalności bariery jelitowej w ramach badań naukowych jest test absorpcji cukrów (ang. sugar absorption test, SAT) opierający się na różnicy w szlakach absorpcji laktozy (transport parakomórkowy) i mannitolu (transport transkomórkowy). Do tej pory nie oceniono, czy SAT może zostać zastąpiony przez analizę innych markerów uszkodzenia jelita takich jak zonulina (marker przepuszczalności jelit) czy kalprotektyna i beta-defensyna-2 (markery stanu zapalnego jelita) celem oceny przepuszczalności bariery jelitowej w okresie okołoprzeszczepowym. Brakuje także danych na temat charakterystycznych zaburzeń metabolomu rozumianego jako całość metabolitów obecnych w ustroju, występujących po allo-HCT, szczególnie tych, które mogą być związane z występowaniem aGVHD. Ocena metabolomu możliwa jest dzięki nowej technice „omicznej”, czyli metabolomice, polegającej na identyfikacji i analizie metabolitów za pomocą m.in. chromatografii cieczowej lub gazowej połączonej ze spektrometrią mas (ang. liquid chromatography - mass spectrometry, LC-MS, ang. gas chromatography - mass spectrometry, GC-MS) czy spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. nuclear magnetic resonance, NMR) oraz analizie uzyskanych danych przy pomocy dedykowanego oprogramowania.

Rozprawa doktorska składa się z trzech powiązanych tematycznie publikacji naukowych, których celem była ocena przepuszczalności bariery jelitowej u chorych



---

poddawanych allo-HCT za pomocą SAT i analizy markerów uszkodzenia bariery jelitowej, a także ocena zmian metabolomu u biorców allo-HCT, ze szczególnym uwzględnieniem chorych, u których stwierdzono aGVHD w okresie poprzyszczepowym.

Wyróżniono następujące cele szczegółowe:

1. Ocena przepuszczalności bariery jelitowej za pomocą SAT.
2. Analiza związku między przepuszczalnością bariery jelitowej a czynnikami zależnymi od chorego oraz od przeszczepienia.
3. Analiza związku między przepuszczalnością bariery jelitowej a wystąpieniem powikłań w okresie poprzyszczepowym (aGVHD, powikłania infekcyjne, zapalenie śluzówek).
4. Ocena uszkodzenia bariery jelitowej za pomocą analizy stężenia biomarkerów w kale (zonulina, kalprotektyna, beta-defensyna-2).
5. Analiza przydatności oceny markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale jako surogatów przepuszczalności bariery jelitowej.
6. Analiza związku między stężeniem markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale, a czynnikami zależnymi od chorego oraz od przeszczepienia.
7. Analiza związku między stężeniem markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale, a występowaniem powikłań w okresie poprzyszczepowym (aGVHD, powikłania infekcyjne, zapalenie śluzówek).
8. Ocena profili metabolicznych chorych w okresie okołotransplantacyjnym.
9. Porównanie profili metabolicznych chorych, u których wystąpiła aGVHD z pozostałymi pacjentami.

Cykl publikacji zawiera pracę pogładową oraz dwie prace oryginalne.

W pierwszej pracy pt. *Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting* (doi: 10.3390/jcm10112508) dokonano przeglądu dostępnej literatury dotyczącej bariery jelitowej, koncentrując się na opisie jej struktury i prawidłowego funkcjonowania 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 prawidłowej mikrobioty jelitowej.

---

Celem kolejnej pracy pt. *Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients* (doi: 10.3390/ijms232415962) była ocena przepuszczalności bariery jelitowej i innych potencjalnych markerów uszkodzenia bariery jelitowej u chorych poddawanych allo-HCT w Klinice Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (UCK WUM). Do badania włączono 51 pacjentów. Przepuszczalność jelitowa została oceniona przy pomocy SAT, oceniano także stężenie zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 w kale w okresie okołotransplantacyjnym. W przypadku większości pacjentów poddawanych allo-HCT wykazano nieprawidłową przepuszczalność bariery jelitowej na 7 dni przed rozpoczęciem procedury allo-HCT, co korelowało istotnie z wyższym wskaźnikiem występowania chorób towarzyszących (ang. hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity Index, HCT-CI). Po allo-HCT obserwowaliśmy dalszy wzrost przepuszczalności bariery jelitowej u większości chorych. Nie udowodniono jednak korelacji między wynikami SAT a oceną innych markerów uszkodzenia bariery jelitowej (zonulina, kalprotektyna i beta-defensyna-2). W przypadku chorych, u których wystąpiła aGVHD, obserwowaliśmy istotnie wyższe stężenie kalprotektyny w kale po allo-HCT w porównaniu z pacjentami bez tego powikłania. Wyniki powyższego badania wskazują, że uszkodzenie bariery jelitowej rozwija się przed allo-HCT, nasila się w okresie potransplantacyjnym i poprzedza dalsze powikłania. Nie wykazano jednak aby inne markery uszkodzenia bariery jelitowej były przydatne jako surogaty przepuszczalności jelitowej.

Celem kolejnej pracy pt. *Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. (doi: 10.1016/j.leukres.2024.107435) była ocena profili metabolicznych chorych po allo-HCT, u których w okresie poprzyszczepowym zdiagnozowano aGVHD, w porównaniu do pacjentów bez tego powikłania. W praktyce klinicznej ryzyko rozwoju GVHD ocenia się indywidualnie na podstawie czynników klinicznych, takich jak niezgodność antygenów zgodności tkankowej (ang. Human Leukocyte Antigen, HLA), niezgodność płci, starszy wiek dawcy i/lub biorcy, źródło komórek macierzystych, alloimmunizacja dawcy oraz obecność przeciwciał przeciwko cytomegalowirusowi (ang. Cytomegalovirus, CMV) i wirusowi Epsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus, EBV). Za pomocą metod niecelowanej analizy metabolomicznej oceniono globalne zmiany w metabolizmie aminokwasów, węglowodanów, lipidów, nukleotydów, a także metabolitów pochodzenia bakteryjnego u 38 chorych poddanych allo-HCT w Klinice Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych CSK

---

UCK WUM, spośród których u 15 wystąpiła aGVHD. W porównaniu z pozostałymi pacjentami, w przypadku tych chorych wykazano deregulację profili metabolicznych, która była widoczna już 7 dni przed rozpoczęciem procedury allo-HCT. W tej grupie chorych zidentyfikowano istotne zmiany w metabolizmie lipidów związanych ze szlakiem przekształcania kwasów żółciowych i syntezą cholesterolu. Z uwagi na pilotażowy charakter badania powyższe wyniki jedynie wskazują na potencjalny związek między metabolizmem lipidów a ryzykiem i/lub rozwojem aGVHD, i wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach dotyczących rozwoju aGVHD, szczególnie badań nad modelami predykcji aGVHD.

Podsumowując, cykl prezentowanych prac dotyczy analizy zaburzeń funkcjonowania bariery jelitowej oraz metabolomu po allo-HCT, oraz wpływu powyższych na występowanie powikłań w okresie potransplantacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem aGVHD.

Wyniki przedstawionych badań poszerzają wiedzę na temat wpływu stanu bariery jelitowej oraz metabolomu na wyniki leczenia chorych poddawanych allo-HCT. Wyniki te stanowią podstawę do planowania kolejnych badań ukierunkowanych na rozwój modeli predykcji aGVHD, oraz rozwoju opcji terapeutycznych nacełowanych na ochronę bariery jelitowej prowadzących do optymalizacji opieki medycznej i poprawy wyników leczenia w tej wrażliwej grupie chorych.

---

#### 4. Streszczenie w języku angielskim (wraz z angielską wersją tytułu rozprawy)

##### **Evaluation of the changes in the intestinal barrier permeability after hematopoietic stem cell transplantation.**

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) is often the only curative procedure for various onco-hematologic and non-neoplastic diseases. One of its main limitations is the high mortality associated with the procedure, mainly due to the graft-versus-host disease (GVHD), especially the acute form (aGVHD), and infectious complications. In the last two decades, the intestinal barrier has gained increasing interest as the site of initiation and propagation of these complications.

The intestinal barrier is a complex structure consisting of a layer of epithelial cells covered with mucus inhabited by microorganisms, including bacteria, viruses, and fungi collectively referred to as the intestinal microbiome or intestinal microbiota. An intact intestinal barrier prevents the penetration of bacteria and toxins from the gastrointestinal tract into the bloodstream. On the other hand, intestinal permeability allows for the absorption of essential nutrients, water transport, and electrolytes. However, to date, there is a lack of methods for intestinal barrier evaluation that could be applied in clinical practice. The reference method used in scientific research is the sugar absorption test (SAT), based on the difference in the absorption pathways of lactose (paracellular transport) and mannitol (transcellular transport). So far, it has not been evaluated whether SAT can be replaced by the analysis of other markers of intestinal damage, such as zonulin (a marker of intestinal permeability) or calprotectin and beta-defensin-2 (markers of intestinal inflammation), to assess intestinal barrier permeability in the peri-transplantation period.

There is also a lack of data on characteristic disruptions in the metabolome, understood as the entirety of metabolites present in the body, occurring after allo-HCT, especially those that may be associated with the occurrence of aGVHD. The assessment of the metabolome is possible through a new "omic" technique called metabolomics, involving the identification and analysis of metabolites using techniques such as liquid or gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS, LC-MS) or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and the analysis of obtained data using dedicated software.

The doctoral thesis consists of three thematically related scientific publications, aiming to evaluate the permeability of the intestinal barrier in patients undergoing allo-HCT using SAT and the analysis of markers of intestinal barrier damage. It also includes an assessment of changes in the metabolome in allo-HCT recipients, with a particular focus on patients diagnosed with aGVHD in the post-transplantation period.

---

The following detailed objectives were set:

1. Evaluation of intestinal barrier permeability using SAT.
2. Analysis of the relationship between intestinal barrier permeability and patient- and transplantation-related factors.
3. Analysis of the relationship between intestinal barrier permeability and the occurrence of post-transplantation complications (aGVHD, infectious complications, mucositis).
4. Assessment of intestinal barrier damage using the analysis of biomarker concentrations in feces (zonulin, calprotectin, beta-defensin-2).
5. Assessment of fecal markers of intestinal barrier damage as surrogates for intestinal barrier permeability.
6. Analysis of the relationship between the concentration of fecal markers of intestinal barrier damage and patient- and transplantation-related factors.
7. Analysis of the relationship between the concentration of fecal markers of intestinal barrier damage and the occurrence of post-transplantation complications (aGVHD, infectious complications, mucositis).
8. Evaluation of metabolic profiles of patients in the peri-transplantation period.
9. Comparison of metabolic profiles between patients who experienced aGVHD and other patients.

The publication cycle includes a review article and two original papers.

In the first paper titled "*Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting*" (doi:10.3390/jcm10112508), a review of available literature on the intestinal barrier is conducted, focusing on its structure, normal functioning, evidence of how damage and increased intestinal permeability affect the outcomes of patients after allo-HCT. Methods for assessing intestinal permeability are discussed. Existing therapeutic strategies aimed at protecting the intestinal barrier, with a special emphasis on preserving and restoring normal gut microbiota, are described.

The goal of the next paper titled "*Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients*" (doi: 10.3390/ijms232415962) was to evaluate intestinal barrier permeability and other potential markers of intestinal barrier damage in patients undergoing allo-HCT at the Clinic of Hematology, Transplantology, and Internal Medicine, Central Clinical Hospital of the University Clinical Center of Warsaw Medical University (CSK UCK WUM). Fifty-one patients were included in the study. Intestinal permeability was

---

assessed using SAT, and concentrations of zonulin, calprotectin, and beta-defensin-2 in feces were also evaluated during the peri-transplantation period. For the majority of patients undergoing allo-HCT, abnormal intestinal barrier permeability was demonstrated seven days before the start of the allo-HCT procedure, correlating significantly with a higher hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index (HCT-CI). After allo-HCT, a further increase in intestinal barrier permeability was observed in most patients. However, no correlation was observed between SAT results and the assessment of other markers of intestinal barrier damage (zonulin, calprotectin, and beta-defensin-2). In patients who developed aGVHD, significantly higher levels of calprotectin in feces were observed after allo-HCT compared to patients without this complication. The results of this study indicate that intestinal barrier damage develops before allo-HCT, intensifies in the post-transplantation period, and precedes further complications. However, other markers of intestinal barrier damage were not shown to be useful as surrogates for intestinal barrier permeability.

The aim of the next paper titled "*Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*" (doi: 10.1016/j.leukres.2024.107435) was to assess the metabolic profiles of patients after allo-HCT who were diagnosed with aGVHD during the post-transplantation period, compared to patients without this complication. In clinical practice, the risk of developing GVHD is assessed individually based on clinical factors such as Human Leukocyte Antigen (HLA) and gender mismatch, older age of the donor and/or recipient, source of stem cells, donor alloimmunization, and the presence of antibodies against cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV). Using non-targeted metabolomic analysis methods, global changes in the metabolism of amino acids, carbohydrates, lipids, nucleotides, and bacterial-derived metabolites were evaluated in 38 patients undergoing allo-HCT at the Clinic of Hematology, Transplantology, and Internal Medicine CSK UCK WUM, of whom 15 developed aGVHD. Compared to other patients, those with aGVHD showed deregulation of metabolic profiles, which was evident as early as 7 days before the start of the allo-HCT procedure. Significant changes in lipid metabolism related to the bile acid transformation pathway and cholesterol synthesis were identified in this group of patients. Due to the pilot nature of the study, these results only suggest a potential association between lipid metabolism and the risk and/or development of aGVHD, requiring confirmation in further studies on the development of aGVHD, especially studies on prediction models for aGVHD.

---

In summary, the presented series of papers focuses on analyzing alterations of the intestinal barrier and the metabolome after allo-HCT, and their impact on the occurrence of post-transplantation complications, with special emphasis on aGVHD. The results of the presented studies contribute to expanding knowledge regarding the influence of the intestinal barrier's status and the metabolome on the outcomes of patients undergoing allo-HCT. These findings form the basis for planning further studies aimed at developing prediction models for aGVHD and the development of therapeutic options targeting the protection of the intestinal barrier, optimizing medical care, and improving treatment outcomes in this vulnerable patient group.

---

## **5. Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl, jak i komentujący osiągnięcie naukowe kandydata na tle dotychczasowego stanu wiedzy.**

### **5.1 Procedura przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych**

#### 5.1.1 Wprowadzenie

Transplantacja allogenicznych komórek krwiotwórczych jest często jedyną opcją terapeutyczną mogącą prowadzić do trwałego wyleczenia chorych na różnorodne choroby nowotworowe jak i nienowotworowe. Początkowo allo-HCT stosowano jako postępowanie „ratunkowe” po zastosowaniu bardzo wysokich dawek chemioterapii i radioterapii w przypadku chemo- i radiowrażliwych nowotworów hematologicznych. Podanie komórek krwiotwórczych pozwalało na odtworzenie hematopoezy po zastosowaniu tych wysoce mielotoksycznych schematów leczenia. Dodatkowo stwierdzono, że procedura allo-HCT wzmacnia przeciwnowotworowe działanie chemo- czy radioterapii poprzez efekt „przeszczep przeciw nowotworowi” polegający na aktywnym zwalczaniu komórek nowotworowych w organizmie biorcy przez limfocyty dawcy. W przeciągu ostatnich dekad procedura allo-HCT ulegała ciągłemu doskonaleniu, a wskazania do jej stosowania stale się rozszerzały. Najistotniejszymi czynnikami ograniczającymi ilość wykonywanych allo-HCT oraz wpływającymi na nadal nie w pełni zadowalające wyniki leczenia jest wysoka śmiertelność związana z procedurą, wynikająca przede wszystkim z występowania GVHD oraz powikłań infekcyjnych.

#### 5.1.2 Dane statystyczne i wskazania

Od czasu pierwszego przeszczepienia szpiku w roku 1957, do końca roku 2016 na całym świecie przeprowadzono łącznie 1 298 897 procedur (z tego 42,9% allo-HCT). Ilość przeszczepień wykonywanych rocznie stale wzrasta do 38 425 allo-HCT w 2016 roku<sup>1</sup>. Pierwszy udany zabieg przeszczepienia allogenicznego w Polsce przeprowadził 28 listopada 1984 prof. Wiesław Wiktor Jędrzejczak wraz z Zespołem Przeszczepiania Komórek Krwiotwórczych Zakładu Immunologii i Klinicznego Oddziału Izotopowego Centralnego Szpitala Klinicznego Wojskowej Akademii Medycznej w Warszawie. Sześćioletnia pacjentka, u której w niemowlęctwie rozpoznano niedokrwistość Diamonda-Blackfana, otrzymała szpik od swojej zgodnej w zakresie HLA siostry tego czasu transplantologia w Polsce dynamicznie się rozwija. W 2023 roku w bazie Poltransplantu zanotowano 292 pobrania komórek krwiotwórczych dla biorców w Polsce oraz 1 430 pobrań dla biorców zagranicznych<sup>2</sup>. Najczęstszymi wskazaniami do allo-HCT są: białaczki oraz zespół mielodysplastyczny, inne to m.in.: chłoniak Hodgkina, chłoniaki nieziarnicze, nowotwory



---

mieloproliferacyjne, anemia aplastyczna, szpiczak plazmocytowy czy przewlekła białaczka limfocytowa.

### 5.1.3 allo-HCT – zasady postępowania

Procedura allo-HCT obejmuje:

- kwalifikację do allo-HCT,
- poszukiwanie i dobór dawcy komórek krwiotwórczych,
- pobranie komórek krwiotwórczych do przeszczepienia,
- kondycjonowanie,
- przeszczepienie komórek krwiotwórczych,
- opiekę w okresie poprzszczepowym.

#### *Kwalifikacja*

W przypadku chorych ze wskazaniami do przeprowadzenia allo-HCT należy dokładnie ocenić zaawansowanie nowotworu oraz określić wydolność narządów (wątroby, nerek, serca i płuc), wykluczyć czynne zakażenia, oznaczyć grupę krwi. Zaleca się przeprowadzenie konsultacji: laryngologicznej, stomatologicznej i ginekologicznej. Dla każdego chorego określa się HCT-CI, który pozwala na szacowanie ryzyka zgonu niezwiązanego z nawrotem choroby podstawowej po allo-HCT, opierając się na obecności chorób współistniejących (m.in. układu krążenia, cukrzycy, zapalnych chorób jelit, wywiadu udaru mózgu, nowotworu litego, otyłości, oraz zaburzeń psychiatrycznych) przed HCT<sup>3</sup>.

#### *Strategia wyboru dawcy*

Dawcę do przeszczepienia allogenicznego dobiera się na podstawie badań antygenów HLA klasy I (HLA A, B i C) oraz klasy II (HLA DR i DQ). Optymalnymi dawcami jest rodzeństwo, zgodne pod względem HLA (zgodność 10/10). W przypadku chorób o wysokim ryzyku, gdzie allo-HCT stanowi jedyną szansę na wyleczenie pacjenta, akceptuje się dawców, którzy nie są w pełni zgodni (zgodność 9/10 czy 8/10). Inne rodzaje przeszczepień to przeszczepienie komórek od niespokrewnionego dawcy (w pełni lub częściowo zgodnego w HLA), przeszczepienie od dawcy haploidentycznego, najczęściej od rodzica lub dziecka (zgodność HLA w jednym haplocyfie), a także rzadko stosowane przeszczepienie krwi pępowinowej od niespokrewnionych dawców<sup>6</sup>.

---

### *Pobranie komórek krwiotwórczych*

Źródłem komórek krwiotwórczych jest krew obwodowa lub szpik kostny. Obecnie około 70% wszystkich procedur allo-HCT przeprowadza się z udziałem komórek krwiotwórczych pozyskanych z krwi obwodowej dawcy po mobilizacji poprzez podawanie czynnika wzrostu kolonii granulocytów (ang. granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)<sup>4</sup>. Komórki krwiotwórcze uzyskiwane są w procesie aferezy (leukaferazy) rozpoczynanym 4-5 dni od zakończenia przyjmowania G-CSF. Uważa się, iż do przeprowadzenia bezpiecznej procedury potrzeba około  $3-4 \times 10^6$  komórek CD34+ na kg masy ciała. Drugim źródłem komórek krwiotwórczych jest szpik kostny. Pobranie szpiku kostnego przeprowadza się w znieczuleniu ogólnym w warunkach bloku operacyjnego. Polega ono na wielokrotnym nakłuwaniu talerzy biodrowych, głównie w okolicach kolców biodrowych tylnych z aspiracją szpiku kostnego. Minimalna ilość komórek CD34+ pochodzących ze szpiku kostnego potrzebna do przeprowadzenia procedury allo-HCT to  $1 \times 10^6$  komórek na kg masy ciała biorcy. Bardzo rzadko wykorzystywanym obecnie źródłem komórek krwiotwórczych jest krew pępowinowa. Wynika to z kosztowności procedury i zbyt małej ilości komórek krwiotwórczych w materiale pobieranym od jednego dawcy<sup>6</sup>.

### *Kondycjonowanie*

Kondycjonowanie oznacza procedurę przygotowawczą biorcy polegającą na podaniu wysokodawkowej chemioterapii i niekiedy zastosowaniu napromieniania całego ciała celem zniszczenia komórek nowotworu oraz wywołania immunoablacji umożliwiającej wszczepienie komórek dawcy. Wyróżnia się protokoły mieloablacyjne (po których nie występuje samoistna regeneracja układu krwiotwórczego) oraz protokoły o zredukowanej intensywności (ang. reduced intensity conditioning, RIC), w przypadku których występuje przedłużona cytopenia, ale możliwa jest odnowa autologiczna. Obecnie w przypadku przeszczepienia od dawcy spokrewnionego lub nie w pełni zgodnego, biorcy podaje się również globulinę antytymocytarną celem zniszczenia limfocytów T dawcy, co ma zmniejszać ryzyko wystąpienia GVHD. Materiał przeszczepowy zawierający komórki krwiotwórcze podaje się choremu w formie wlewu dożylnego<sup>6</sup>.

### *Okres poprzyszczepowy*

Okres poprzyszczepowy dzieli się na: wczesny (do dnia +30), pośredni (do dnia +100) i późny (po dniu +100). Chorzy po allo-HCT w każdym z tych okresów (zwłaszcza w okresie wczesnym) wymagają stałego nadzoru z uwagi na wysokie ryzyko wystąpienia powikłań

---

potencjalnie zagrażających zdrowiu i życiu. Powikłania w okresie wczesnym obejmują przede wszystkim powikłania hematologiczne, czyli pancytopenię i wynikające z niej ryzyko infekcji oraz powikłań krwotocznych, oraz uszkodzenie błony śluzowej przewodu pokarmowego. Rzadziej obserwuje się śródmiąższowe nieinfekcyjne uszkodzenie płuc, kardiomiopatie, zaburzenia funkcji ośrodkowego układu nerwowego, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, niewydolność nerek i chorobę wenookluzyjną wątroby<sup>5</sup>.

## **5.2 Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi**

Szczególnym powikłaniem znacznie pogarszającym rokowanie chorych jest GVHD związana z aktywnością immunokompetentnych komórek dawcy, zwłaszcza limfocytów T, skierowaną przeciwko tkankom i narządom biocy. Wyróżnia się ostrą GVHD (ang. acute GVHD) oraz przewlekłą postać GVHD (ang. chronic GVHD, cGVHD). Czynniki ryzyka wystąpienia GVHD są: brak zgodności HLA, różnice płci, starszy wiek dawcy i/lub biocy, źródło komórek macierzystych z krwi obwodowej, alloimmunizacja dawcy oraz zakażenie wirusem CMV i EBV<sup>6</sup>.

Ostra postać GVHD występuje zazwyczaj w ciągu pierwszych 100 dni od przeszczepienia. Podejrzenie aGVHD opiera się na obrazie klinicznym, obejmującym cechy ostrej choroby obejmującej zazwyczaj skórę, wątrobę i przewód pokarmowy. Klinicznie choroba manifestuje się poprzez zmiany skórne, uszkodzenie wątroby o charakterze cholestatycznym oraz zajęcie przewodu pokarmowego (biegunka). Z uwagi na to, że podobne objawy mogą wynikać z toksyczności leczenia lub powikłań infekcyjnych pożądane jest potwierdzenie diagnozy badaniem histopatologicznym wycinka zajętego narządu. Ocena nasilenia ciężkości aGVHD wg Międzynarodowego Konsorcjum Mount Sinai Acute GVHD (ang. The Mount Sinai Acute GvHD International Consortium, MAGIC) przedstawiona jest w Tabeli 1<sup>7</sup>.

Przewlekła postać GVHD klinicznie przypomina choroby autoimmunologiczne, takie jak twardzina układowa lub zespół Sjögrena. Stanowi główną przyczynę późnej śmiertelności po przeszczepieniu, niezwiązaną ze wznową choroby podstawowej. Objawy cGVHD mogą dotyczyć dowolnego narządu, ale najczęściej obejmują skórę, wątrobę, oczy (zespół suchego oka), jamę ustną, stawy, przełyk i rzadziej płuca (zarostowe zapalenie oskrzelików lub kryptogenne organizujące się zapalenie płuc) czy dolny odcinek przewodu pokarmowego. Rozpoznanie cGvHD opiera się na zidentyfikowaniu charakterystycznych objawów, które można zaklasyfikować do 4 kategorii: patognomicznych, wskazujących, mniej swoistych lub wspólnych dla aGVHD i cGVHD.

Tab. 1. Klasyfikacja MAGIC. Stopniowanie narządowe i stopniowanie ogólne.

| A. Stopniowanie narządowe |                                    |                                       |                                  |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| stopień                   | skóra<br>%<br>powierzchni<br>ciała | układ<br>pokarmowy<br>biegunka (litr) | wątroba<br>bilirubina<br>(mg/dl) |
| 1                         | <25                                | 0,5-1,0                               | 2,0-3,0                          |
| 2                         | 25-50                              | 1,0-1,5                               | 3,1-6,0                          |
| 3                         | >50                                | >1,5                                  | 6,1-15,0                         |
| 4                         | pęcherze,<br>złuszczenie           | stopień 3 + ból,<br>niedrożność       | >15                              |
| B. Stopniowanie ogólne    |                                    |                                       |                                  |
| stopień                   | skóra                              | układ<br>pokarmowy                    | wątroba                          |
| I                         | 1-2                                | nie                                   | nie                              |
| II                        | 1-3                                | 1                                     | 1                                |
| III                       | 2-3                                | 2-3                                   | 2-3                              |
| IV                        | 2-4                                | 2-4                                   | 2-4                              |

Najważniejszym elementem zapobiegania GVHD jest dobór zgodnego dawcy. Profilaktyka farmakologiczna polega na stosowaniu inhibitorów kalcyneuryny (cyklosporyna, takrolimus) w skojarzeniu z metotreksatem lub mykofenolanem mofetylu oraz globuliny antytymocytarnej. Leczenie aGVHD i cGVHD zależy od stopnia zaawansowania choroby, ale w pierwszej linii leczenia rutynowo stosuje się glikokortykosteroidy podawane miejscowo (stopień I) i/lub ogólnoustrojowo, zazwyczaj metyloprednizolon w dawce 1-2 mg/kg masy ciała. Oporność na glikokortykosteroidy jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, a leczenie w tej grupie chorych jest trudne i indywidualizowane. W leczeniu opornych postaci aGVHD i cGVHD stosuje się ruksolitynib, mykofenolan mofetylu, inhibitory czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) takie jak etanercept czy infliksymab, imatynib, rytuksymab oraz fotoferezę pozaustrojową<sup>6,8</sup>.

### 5.3 Rola bariery jelitowej u biorców allo-HCT

#### 5.3.1 Bariera jelitowa

Bariera jelitowa to złożona struktura składająca się z warstwy komórek nabłonka (enterocytów), pokrytych śluzem, zamieszkanym przez mikroorganizmy, m.in. bakterie, wirusy i grzyby, łącznie nazywane mikrobiomem jelitowym lub mikrobiotą jelitową<sup>9</sup>. Błony enterocytów są ze sobą połączone złączami szczelnymi, złączami przylegania i

---

desmosomami<sup>10</sup>. Śluz, wydzielany głównie przez komórki kubkowe, tworzy niejednorodną strukturę. Wewnętrzna warstwa jest praktycznie sterylna, wspomaga wchłanianie składników odżywczych, zapewnia nawilżenie nabłonka i chroni komórki nabłonkowe przed siłami ścinania i enzymami przewodu pokarmowego. Zewnętrzna warstwa śluzu zapobiega przyleganiu bakterii do nabłonka jelitowego i zawiera kilka substancji przeciwbakteryjnych, takich jak immunoglobulina A, defensyny, rybonukleazy i lizozymy<sup>11</sup>. Komensalna mikrobiota jelitowa zajmuje zewnętrzną warstwę śluzu. Zdrowy człowiek jest gospodarzem dla około  $10^{14}$  mikroorganizmów: ponad 2000 gatunków bakterii (z przewagą Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria i Proteobacteria), a także wirusów i grzybów, w zależności m.in. od wieku, płci, wskaźnika masy ciała i diety<sup>12</sup>.

Mikrobiom jelitowy oddziałuje z organizmem gospodarza na wiele sposobów; poprzez bezpośrednie interakcje z komórkami bariery jelitowej lub za pośrednictwem różnych metabolitów pochodzenia bakteryjnego. Komensalne bakterie zapobiegają wzrostowi patogenów poprzez zajmowanie niszy, konkutowanie o składniki odżywcze i produkcję bakteriocyn. Ponadto wspomagają wydzielanie peptydów przeciwbakteryjnych m.in. defensyn i katelicydyn, poprzez aktywację receptorów rozpoznających wzorce (receptory Toll-podobne i receptory Nod-podobne) w komórkach nabłonka jelitowego<sup>13</sup>. Kolejną ważną rolę bakterii jelitowych jest fermentacja resztek pokarmowych do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. short chain fatty acids, SCFAs), które stanowią źródło energii dla kolonocytów. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe utrzymują ciągłość śródbłonka jelitowego poprzez poprawę integralności złączy oraz promowanie równowagi między reakcjami pro- i przeciwzapalnymi poprzez zestaw receptorów kwasów tłuszczowych oraz indukcję komórek T regulatorowych<sup>14</sup>. Nienaruszona bariera jelitowa zapobiega przenikaniu bakterii i toksyn z przewodu pokarmowego do ustroju. Z drugiej strony, przepuszczalność jelit umożliwia wchłanianie niezbędnych składników odżywczych, transport wody i elektrolitów.

### 5.3.2 Wpływ zaburzeń bariery jelitowej na wyniki allo-HCT - opis stanu wiedzy oraz wyników badań zawartych w cyklu publikacji

W ciągu ostatnich dwudziestu lat nastąpił ogromny wzrost zainteresowania związkiem między funkcją bariery jelitowej a wynikami allo-HCT. Badania na modelach zwierzęcych dowiodły, że uszkodzenie bariery jelitowej spowodowane m.in. kondycjonowaniem sprzyja translokacji wzorców molekularnych związanym z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) do blaszki właściwej i aktywacji szlaków prozapalnych leżących u podstaw inicjacji GVHD<sup>15</sup>, za to manipulacja składem mikrobioty jelitowej może hamować

---

stan zapalny w jelitach prowadząc do zmniejszenia ryzyka rozwoju GVHD<sup>16</sup>. Podawanie kwasu masłowego do komórek nabłonka jelitowego w modelu allo-HCT poprawiało integralność połączeń międzykomórkowych, zmniejszyło apoptozę i prowadziło do ustępowania GVHD *in vitro*. Ponadto modyfikacja komensalnej mikrobioty za pomocą 17 wybranych szczepów, produkujących kwas masłowy bakterii z rodzaju *Clostridia*, również zmniejszyła nasilenie GVHD *in vitro* oraz u myszy<sup>17</sup>. Wyniki badań na pacjentach poddawanych allo-HCT dowodzą, że dysbioza i dominacja poszczególnych rodzajów bakteryjnych zwiększa ryzyko bakteriemii w okresie poprzyszczepowym<sup>18</sup> natomiast obecność bakterii komensalnych z rodzaju *Blautia* wiąże się z redukcją ryzyka zgonu z powodu GVHD<sup>19</sup>. Udowodniono także, że utrata różnorodności mikrobiomu występuje częściej u chorych z jelitową postacią GVHD<sup>20</sup>, a stosowanie antybiotykoterapii szerokospektralnej skutkuje dysbiozą i zwiększonym ryzykiem wystąpienia GVHD<sup>21</sup>.

W warunkach klinicznych po przeszczepieniu uważnie obserwuje się toksyczność ze strony przewodu pokarmowego oceniając nasilenie zapalenia błony śluzowej jamy ustnej na podstawie skali Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organisation, WHO). Stan bariery jelitowej wyrażony poprzez przepuszczalność jelit po allo-HCT jest jedynie przedmiotem badań klinicznych i nadal brakuje łatwo dostępnych, zwalidowanych markerów, które pomogłyby wyodrębnić chorych najbardziej dotkniętych uszkodzeniem bariery jelitowej. W badaniach klinicznych przepuszczalność jelitowa oceniana jest jako stosunek wydalania z moczem różnych przyjętych próbek w porównaniu do kontroli – głównie za pomocą testu wchłaniania kwasu wersenowego znakowanego chromem 51 (ang. chromium-51 ethylenediamine tetraacetic acid, 51CrEDTA) lub SAT, który opiera się na różnicach w szlakach absorpcji laktozy i mannitolu. Zwiększony stosunek laktulozy, która wchłaniana jest na drodze transportu parakomórkowego do mannitolu, który z uwagi na swoją wielkość podlega transportowi transkomórkowemu, w 6-godzinnej zbiórce moczu po przyjęciu doustnego roztworu zawierającego obie substancje (ang. lactulose to mannitol ratio, LMR) wskazuje na zwiększenie przepuszczalności jelitowej<sup>22</sup>. Kilka badań oceniających funkcję bariery jelitowej po allo-HCT udokumentowało, że przepuszczalność jelit znacznie wzrasta po przeszczepieniu. Zaobserwowano również, że wzrost przepuszczalności jelit w okresie poprzyszczepowym poprzedza wystąpienie zapalenia błony śluzowej jamy ustnej, ale nie jest z nim ściśle powiązane. Dlatego też ocena uszkodzenia jelit na podstawie rozległości zapalenia błony śluzowej w jamie ustnej u tego samego pacjenta nie jest wystarczająca dla oszacowania stanu bariery jelitowej<sup>23,24,25</sup>.

---

Przepuszczalność oraz stan bariery jelitowej był obiektem badań u chorych poddawanych allo-HCT w Klinice Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, UCK WUM. Do badania włączono 51 pacjentów. Przepuszczalność jelitowa została oceniona za pomocą SAT, dodatkowo oceniano stężenie markerów uszkodzenia jelita tj. zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 w kale w okresie okołotransplantacyjnym.

Zonulina jest niedawno odkrytym markerem przepuszczalności jelitowej. Uważa się, że jej działanie jest podobne do enterotoksyny produkowanej przez *Vibrio cholerae* (ang. zonula occludens toxin, ZOT) prowadzące do rozluźnienia połączeń ścisłych i zwiększania transportu parakomórkowego przez ścianę jelita<sup>26,27</sup>. Od czasu odkrycia zonuliny przez Alessio Fasano w 2000 roku, białko to jest wykorzystywane jako biomarker chorób o podłożu autoimmunologicznym, przede wszystkim celiakii i cukrzycy typu 1 oraz nowotworów i chorób neurozapalnych<sup>28</sup>. Wydaje się jednak, że nie zawsze uwalnianie zonuliny jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za wzrost przepuszczalności jelit.

Beta-defensyna-2 w kale to uznany wskaźnik stanu zapalnego jelit, który był wykorzystywany w kilku badaniach klinicznych głównie w populacji dziecięcej, do oceny wpływu interwencji dietetycznych na kolki niemowlęce<sup>29</sup>, przepuszczalność bariery jelitowej<sup>30</sup>, występowanie atopii<sup>31</sup> i infekcji<sup>32</sup>. Zgodnie z naszą wiedzą, stężenia zonuliny i beta-defensyny-2 w kale nie były wcześniej oceniane u pacjentów poddawanych allo-HCT.

Kalprotektyna jest czułym markerem stanu zapalnego błony śluzowej jelita<sup>33</sup>. Ostatnio zaobserwowano, że ilość makrofagów produkujących kalprotektynę pochodzących od dawcy w błonie śluzowej okrężnicy jest znacząco zwiększona u biorców z potwierdzoną aGVHD w porównaniu z pacjentami bez aGVHD, ponownie podkreślając, że stan zapalny na poziomie ściany jelita jest ściśle związany z rozwojem aGVHD<sup>34</sup>.

U większości pacjentów poddających się allo-HCT w naszym Ośrodku wykazano zwiększoną przepuszczalność bariery jelitowej wyrażoną jako LMR po SAT na 7 dni przed rozpoczęciem procedury allo-HCT, co korelowało istotnie z wyższym wskaźnikiem HCT-CI. Po allo-HCT obserwowaliśmy dalszy wzrost przepuszczalności bariery jelitowej wyrażony jako  $\Delta$ LMR. Zaobserwowaliśmy również trend wskazujący na zwiększone ryzyko wzrostu przepuszczalności bariery jelitowej po allo-HCT u starszych chorych. Nie udało się jednak udowodnić korelacji między wynikami SAT a oceną innych markerów uszkodzenia bariery jelitowej (zonulina, kalprotektyna i beta-defensyna-2). W przypadku chorych, u których wystąpiła aGVHD obserwowaliśmy istotnie wyższe mediany stężeń kalprotektyny w kale po allo-HCT w porównaniu z pacjentami bez tej komplikacji. Wyniki powyższego badania wskazują, że uszkodzenie bariery jelitowej rozwija się przed allo-HCT, nasila się w okresie

---

potransplantacyjnym i poprzedza dalsze powikłania. Nie udało się jednak wykazać, aby inne markery uszkodzenia bariery jelitowej były przydatne jako surogaty przepuszczalności jelitowej.

W ciągu ostatnich kilku dekad badania proteomiczne ujawniły kilka potencjalnych osoczowych biomarkerów GVHD, jednak żaden z nich nie znalazł dotąd zastosowania w praktyce klinicznej w Polsce<sup>35,36,37</sup>. Najnowszym podejściem w badaniach mających na celu poszukiwania swoistych biomarkerów jest analiza metabolomiczna. Metabolomika to kolejna wykorzystywana w nauce technika „omiczna” (poza genomiką analizującą genom, transkryptomiką analizującą mRNA i proteomiką analizującą białka). Metabolomika ocenia globalne zmiany w metabolomie rozumianym jako zbiór drobnocząsteczkowych substancji takich jak aminokwasy, cukry, lipidy, nukleotydy, a także metabolity pochodzące z mikrobiomu w różnych próbkach, najczęściej surowicy, ale także moczu czy płynu mózgowo-rdzeniowego<sup>38</sup>. Do technik analitycznych wykorzystywanych w metabolomice należy m.in LC-MS czy spektroskopia NMR. Uzyskane dane wymagają następnie analizy przy pomocy dedykowanego oprogramowania np. XCMS, MZmine czy Metalign<sup>39</sup>. Porównywaniu profilu metabolitów między grupami pacjentów (np. chorzy vs zdrowi) lub między różnymi etapami danej choroby z wykorzystaniem dyskryminacyjnych analiz statystycznych pozwala na wytypowanie nowych potencjalnych biomarkerów<sup>40</sup>.

Jak dotąd ilość badań ukierunkowanych na ocenę profili metabolicznych chorych poddawanych allo-HCT jest znikoma. Dotychczasowe badania wykazały różne profile metaboliczne przed przeszczepieniem u pacjentów, u których ostatecznie rozwinęła się aGVHD z chorymi bez tego powikłania. Opisano zmieniony metabolizm immunoregulacyjnych aminokwasów rozgałęzionych (leucyny, izoleucyny i waliny) oraz zmienione poziomy potencjalnie prozapalnych metabolitów tyrozyny pochodzenia bakteryjnego. Autorzy wysunęli hipotezę, iż te metabolity modyfikują lub aktywują komórki immunokompetentne biorcy, tym samym zwiększając lub inicjując reaktywność autoimmunologiczną<sup>41</sup>. W innym małym badaniu obejmującym 14 pacjentów wykazano prozapalny profil metaboliczny u pacjentów, którzy ostatecznie rozwijali GVHD. Wytypowano 5 potencjalnych biomarkerów zwiększonego ryzyka wystąpienia aGVHD przed przeszczepieniem: kwas 2-aminomasłowy, 1-monopalmityna, diacyloglicerole (DG 38:5, DG 38:6) oraz kwas tłuszczowy 20:1<sup>42</sup>. Inne badania wykazały, że zmiany w metabolizmie kwasu stearynowego i palmitynowego<sup>43</sup>, metabolitów pochodzących z mikroflory<sup>44</sup>, szlaku metabolizmu ornityny, argininy i proliny<sup>45</sup> w okresie po przeszczepieniu były powiązane z rozwojem aGVHD.



---

W kolejnym etapie naszej pracy oceniliśmy metabolom 38 pacjentów, z których u 15 rozwinęła się aGVHD za pomocą analizy niecelowanej „non-targeted”. Niecelowana metabolomika opiera się na identyfikacji i porównaniu mas na platformie XCMS, będącej jednym z najczęściej używanych oprogramowań stosowanych przy analizie danych pochodzących z LC-MS. W badaniu wykazano, że metabolom chorych, u których wystąpiła aGVHD różni się istotnie od metabolomu chorych bez tego powikłania i jest to widoczne już 7 dni przed allo-HCT. Zidentyfikowano metabolity należące do szlaku przemian kwasów żółciowych oraz syntezy cholesterolu, których stężenia w surowicy istotnie różniły się między grupami w danych punktach czasowych. Zidentyfikowano dwa metabolity szlaku transformacji kwasów żółciowych: 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetraol i kwas glikocholowy oraz metabolity syntezy cholesterolu: 3-dehydro-4-metylozymosterol oraz 5 $\alpha$ -cholesta-8,24-dien-3-onezymosterol. Wyniki badania wykazały potencjalny związek między metabolizmem lipidów, szczególnie szlakami transformacji kwasów żółciowych i syntezy cholesterolu oraz etiopatogenezą aGVHD. Głównymi ograniczeniami badania są mała 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. Nie jest pewne, czy wyniki odzwierciedlają wpływ allo-HCT na profil metaboliczny, czy raczej charakteryzują populację biorców allo-HCT ze zwiększonym ryzykiem rozwoju aGVHD. Wyniki opisane w publikacji wymagają dalszych badań i walidacji, ale stanowią wstęp dla projektów oceniających związek między rozwojem aGVHD a osoczym stężeniem metabolitów (także pochodzenia bakteryjnego), aby głębiej poznać etiopatogenezę oraz zdobyć nowe narzędzia do przewidywania i monitorowania aGVHD.

### 5.3.3 Uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji

Prace tworzące cykl publikacji w sposób spójny poruszają tematykę oceny oraz znaczenia bariery jelitowej w kontekście allo-HCT. Celem cyklu było dogłębne zbadanie zmian zachodzących na poziomie bariery jelitowej u chorych w okresie okołoprzeszczepowym oraz próba wyznaczenia potencjalnego markera wyodrębniającego chorych ze znacznymi zaburzeniami bariery jelitowej będących zagrożonych zwiększonym ryzykiem wystąpienia aGVHD.

W publikacji nr 1 przeanalizowano dostępną literaturę dotyczącą wpływu bariery jelitowej na wyniki allo-HCT uwzględniając potencjalne metody terapeutyczne nacelowane na zachowanie bariery jelitowej po allo-HCT.

---

W publikacji nr 2 oceniono przepuszczalność bariery jelitowej u chorych po allo-HCT za pomocą testu wchłaniania cukrów oraz po raz pierwszy porównano tę metodę z oceną markerów uszkodzenia jelita tj. zonuliną, kalprotektyną, beta-defensyną-2.

W publikacji nr 3 dokonano analizy profili metabolicznych chorych po allo-HCT ze szczególnym uwzględnieniem porównania chorych, którzy rozwinęli aGVHD z chorymi bez tego powikłania.

## **6. Założenia i cel pracy**

Celem projektu była ocena przepuszczalności bariery jelitowej u biorców allo-HCT za pomocą SAT oraz porównanie tej metody z oceną markerów uszkodzenia bariery jelitowej tj. zonuliny, kalprotektyny, beta-defensyny-2 w okresie okołoprzeszczepowym oraz ocena zmian metabolomu u biorców allo-HCT, ze szczególnym uwzględnieniem chorych, którzy rozwinęli aGVHD w okresie poprzyszczepowym.

Badaniem zostali objęci pacjenci poddawani allo-HCT z powodu nowotworów hematologicznych oraz chorób nienowotworowych. Analizowano dane kliniczne (m.in. rodzaj kondycjonowania, dane dotyczące przeszczepu, stosowane leczenie; w tym leczenie immunosupresyjne) oraz wyniki badań dodatkowych. Wśród tych ostatnich oceniono stężenia biomarkerów uszkodzenia nabłonka jelit (zonulina, beta-defensyna-2, kalprotektyna w kale), wyniki testu czynnościowego SAT oraz profile metaboliczne chorych.

Otrzymane dane analizowano w kierunku korelacji z częstością GVHD, powikłań infekcyjnych oraz wystąpieniu zapalenia śluzówek.

Wyróżniono następujące cele szczegółowe:

1. Ocena przepuszczalności bariery jelitowej za pomocą SAT.
2. Analiza związku między przepuszczalnością bariery jelitowej a czynnikami zależnymi od chorego oraz od przeszczepienia.
3. Analiza związku między przepuszczalnością bariery jelitowej a wystąpieniem powikłań w okresie poprzyszczepowym (aGVHD, powikłania infekcyjne, zapalenie śluzówek).
4. Ocena uszkodzenia bariery jelitowej za pomocą analizy stężenia biomarkerów w kale (zonulina, kalprotektyna, beta-defensyna-2).
5. Analiza przydatności oceny markerów uszkodzenia bariery jelitowej jako surogatów przepuszczalności bariery jelitowej.
6. Analiza związku między stężeniem markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale, a czynnikami zależnymi od chorego oraz od przeszczepienia.

- 
7. Analiza związku między zawartością markerów uszkodzenia bariery jelitowej w kale, a wystąpieniem powikłań w okresie przeszczepowym (aGVHD, powikłania infekcyjne, zapalenie śluzówek).
  8. Ocena profili metabolicznych chorych w okresie okołotransplantacyjnym.
  9. Porównanie profili metabolicznych chorych, u których wystąpiła aGVHD z pozostałymi pacjentami.

## 7. Kopie opublikowanych prac

### 7.1 Publikacja 1



Review

# Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting

Martyna Tyszka <sup>\*</sup>, Jarosław Biliński and Grzegorz Władysław Basak

Department of Hematology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland; jaroslaw.bilinski@gmail.com (J.B.); grzegorz.basak@wum.edu.pl (G.W.B.)

\* Correspondence: martynamtyszka@gmail.com or mtyszka@wum.edu.pl; Tel.: +48-225992109

**Abstract:** The intestinal barrier consists of an epithelial lining covered with specialized mucus inhabited by intestinal microbiota. An intact gut barrier ensures a resistance to bacteria and toxins translocation. On the other hand, gut permeability allows the absorption of essential nutrients, fluids and ions. This balance is achieved only by the complex structure and functional characteristics of the intestinal barrier. Allogeneic hematopoietic cell transplantation remains the only curative treatment for many hematological diseases, but its application is limited because of possible transplant-related mortality mainly due to graft-versus-host disease and infectious complications. The intestinal barrier has been extensively studied in recent years as the primary site of graft-versus-host disease initiation and propagation. In the present review, we focused on the physiological structure and function of the gut barrier and the evidence of how the disruption of the gut barrier and increased intestinal permeability affects transplant recipients. Finally, therapeutic strategies aiming at intestinal barrier protection with a special focus on microbiome preservation and restoration in the allogeneic hematopoietic cell transplantation setting are discussed.

**Keywords:** intestinal barrier; gut permeability; microbiome; allogeneic hematopoietic cell transplantation; graft-versus-host disease



**Citation:** Tyszka, M.; Biliński, J.; Basak, G.W. Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2508. <https://doi.org/10.3390/jcm10112508>

Academic Editors: Anastasios Koulaouzidis, Wojciech Marlicz and Karolina Skonieczna-Żydecka

Received: 13 May 2021

Accepted: 1 June 2021

Published: 6 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



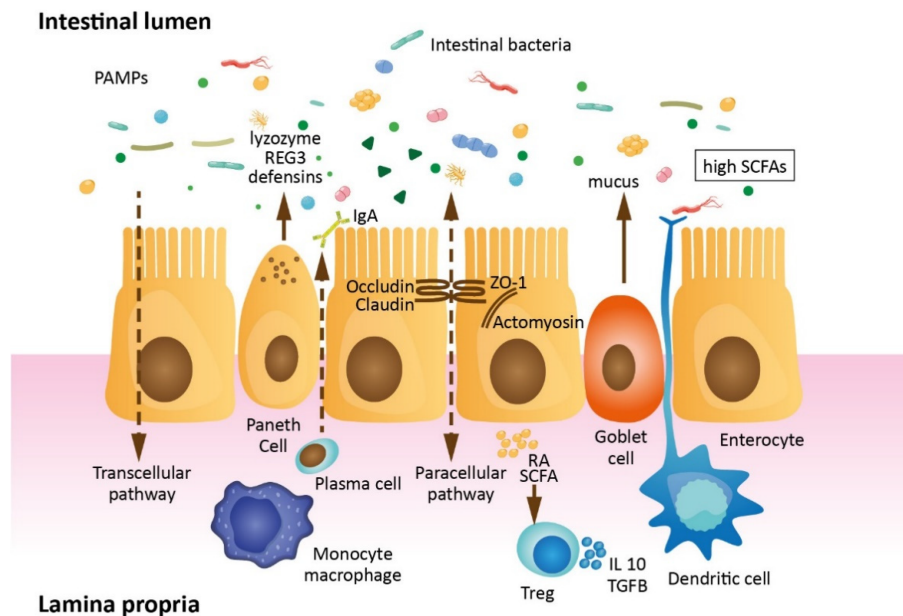
**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

In the past few decades, many studies investigating the connection between intestinal barrier function and allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) outcomes, especially its major complication—graft-versus-host disease (GVHD), were conducted. Evidence on the intestinal barrier as the primary site of GVHD development is piling up, although we still do not fully understand the cellular and molecular mechanisms of GVHD initiation and propagation. Intestinal barrier disruption caused by conditioning promotes pathogen-associated molecular pattern (PAMP) translocation to the lamina propria and activation of the proinflammatory pathways at the basis of GVHD initiation [1]. The protective function of a proper intestinal barrier and healthy microbiota compartment was investigated in relation to GVHD incidence. In a multicenter study, preserved microbiome diversity assessed with 16S rRNA sequencing at the time of hematopoietic cell engraftment was associated with significantly lower mortality [2]. Every single research paper leading to a better understanding of the relationship between intestinal barrier disruption and outcomes of allo-HCT is bringing us closer to the more effective GVHD prophylaxis and treatment. The overall goal of this review is to provide a comprehensive analysis of the intestinal barrier function in patients subjected to allo-HCT. In this article, we focused on the physiological structure and function of the intestinal barrier, the evidence on disruptions of the gut barrier and increased intestinal permeability in allo-HCT recipients and, finally, therapeutic strategies for intestinal barrier preservation and restoration.

### 1.1. Intestinal Barrier Anatomy and Physiology

The intestinal barrier is formed by consecutive layers, including intestinal epithelial cells (IECs) covered with mucus inhabited by the intestinal microflora and innermost lamina propria (Figure 1). Enterocyte membranes are interconnected with each other with junctional complexes: tight junctions (TJs), adherens junctions (AJs) and desmosomes. Apically placed TJs are formed by transmembrane and peripheral scaffolding proteins. AJs consisting of transmembrane protein E-cadherin connected to the intracellular skeleton are critical for TJ assembly and cell-to-cell adhesion. Desmosomes built by desmoglein and desmocollin are believed to strengthen the intercellular cohesion [3–6]. The mucus primarily secreted by goblet cells forms an inhomogeneous structure. The inner layer is virtually sterile, assists nutrient absorption, ensures epithelial hydration and protects the epithelial cells from luminal shear stress and digestive tract enzymes. The outer layer of mucus prevents bacteria from adhering to the intestinal epithelium and contains several antimicrobial agents, such as secretory immunoglobulin A, defensins, ribonucleases and lysozymes [7].



**Figure 1.** Intestinal barrier. Apically placed tight junctions formed by transmembrane proteins (e.g., claudins and occludin) and peripheral scaffolding proteins (e.g., zonula occludens; ZO-1) seal the paracellular space between enterocytes and form the barrier limiting the intestinal microorganisms and pathogenic molecules (PAMPs) passage and, on the other hand, enabling the paracellular absorption of the essential nutrients and ions, depending on the size and charge. The lamina propria is inhabited by the cells of the immune system, e.g., T cells, plasma cells, macrophages and dendritic cells. Tregs modulate the immune system into a tolerance to self-antigens and chronic stimuli by the secretion of IL-10 and TGF-beta and suppression of effector T cells. The intestinal barrier is maintained by the SCFAs produced by the commensal bacteria and several protective molecules, i.e., lysozyme, defensins, REG3 and IgA, secreted by specialized cells of the intestinal lining. ZO-1, zonula occludens-1, DAMPs, damage-associated molecular patterns, PAMPs, pathogen-associated molecular patterns, IL-10. Interleukin 10, TGF-beta, transforming growth factor-beta, SCFAs, short-chain fatty acids, REG3, regenerating islet-derived protein 3 and IgA, Immunoglobulin A.

Commensal intestinal microflora (microbiota) occupies the outer layer of the mucus. A healthy individual is host to around  $10^{14}$  microbial organisms: over 2000 species of bacteria (most of which are from the Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria phylum), as well as viruses and fungi, depending on age, gender, body mass index,

mode of birth and diet [8]. The intestinal microbiota interplays with its host in several ways, by direct interactions with the cells of the intestinal barrier or via various microbial metabolites. Commensal bacteria prevent pathogen growths by niche occupation, nutrient competition and the production of several bacteriocins. They also promote the secretion of antimicrobial peptides (AMPs), including defensins and cathelicidins via the activation of pattern recognition receptors (Toll-like receptors and Nod-like receptors) in IECs [9,10]. Another important role of the intestinal bacteria is the fermentation of undigested food residues to short-chain fatty acids (SCFAs), which are the source of energy for colonocytes. SCFAs maintain intestinal endothelium continuity and affect cell morphology by increasing the number of intestinal villi and improving the junctional integrity. They maintain the balance between pro- and anti-inflammatory responses through a set of free fatty acid receptors (FFARs) and the induction of regulatory T cells (Treg cells) expressing transcription factor Foxp3 by the inhibition of the histone deacetylase enzyme [11–13]. Another bacterial metabolite, indoxyl sulfate (IS), which is a derivative of indole, the main tryptophan metabolite, is known to preserve a mixed commensal microbiome by exerting bacteriostatic effects on Gram-negative bacilli and cocci [14] and providing colonization resistance to *Candida albicans* [15]. It also protects the epithelial cell barrier by simultaneously decreasing the expression of the proinflammatory chemokine IL-8 and TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B and increasing the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and type I interferon (IFN1) response [16].

Intestinal stem cells residing at the bottom of the crypts of Lieberkühn allow barrier renewals approximately every 3–5 days. As the fully matured cells undergo apoptosis and are being shed into the intestinal lumen, stem cells proliferate and differentiate into enterocytes, goblet cells, Paneth cells and enteroendocrine cells. Below the epithelial lining lies the lamina propria, populated by cells of the enteric nervous system and immune cells [3,4].

### 1.2. Gut Barrier Permeability

Intestinal permeability is a function that allows the selective transfer of defined molecules across the intestinal wall and nutrient absorption. In healthy individuals, the permeability for electrolytes and nutrients is divided into two main pathways. The paracellular route ensures that 85% of the total influx of molecules is regulated by TJs, and the transcellular route allows solute transportation across the enterocyte membrane. The pore size in the TJ is the primary determinant of mucosal permeability in the presence of intact epithelium transport pathways [17].

A barrier function regulation results from interactions between the microbiota, epithelial cells, immune system and ENS and can be altered by gut microflora modifications, mucus layer alterations and epithelial damage [7].

## 2. Impact of allo-HCT Procedure on Gut Barrier Permeability (Mechanisms and Summary of Studies)

Oral mucositis affects 60–100% of HCT recipients when myeloablative conditioning regimens are used [18]. It is hard to overlook and easy to evaluate with the World Health Organization (WHO) oral mucositis scores. The damage to the gastrointestinal tract is less understood, even though signs and symptoms from the GI tract such as abdominal pain, nausea, vomiting and diarrhea occur often after allo-HCT. The intestinal permeability is most commonly measured by the difference in intestinal barrier passage and fractional urinary excretion of various ingested probes of different sizes. A few studies evaluating intestinal permeability assessed by a <sup>51</sup>CrEDTA absorption test or sugar absorption test (SAT) [19–23] have shown that the gut permeability was raised significantly after the start of conditioning, and it preceded any clinical signs of mucosal damage. The clinical gastrointestinal toxicity and oral mucositis grade did not strictly correspond with the intestinal injury. These results suggest that it may be misleading to estimate the extent of damage to the GI tract based on the grade of the oral mucositis at the posttransplant period in the same patient.

Another way to investigate the gut barrier disruption is the evaluation of the serum levels of various biomarkers. Those can be divided into two categories: bacteria-related molecules like lipopolysaccharide (LPS) [24] and circulating endotoxin core antibodies (EndoCAB) [25] or direct intestinal barrier damage markers like citrulline produced by small intestinal enterocytes [26,27], fatty acid-binding proteins (FABPs) [28] or tight junctions proteins—claudins [29]. A significant decrease in the serum concentrations of citrulline after HCT was seen in a study of 32 patients receiving myeloablative therapy. In a subgroup of 12 patients, a lower serum citrulline was correlated with the onset of oral mucositis and increased intestinal permeability measured with SAT. Serum citrulline appears to be a simple test to implement in studies on the gut barrier after HCT [26]. In another study, high serum levels of IL-8, lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and C-Reactive Protein (CRP) corresponded with citrulline concentration nadir and increased intestinal permeability measured with SAT after allo-HCT. The authors suggested that the observed systemic inflammatory response after HCT began with intestinal barrier damage [30]. In a study focusing on the severity of GVHD and intestinal toxicity assessed by a <sup>51</sup>Cr-EDTA absorption test, it was confirmed that patients with mild acute GVHD had better-preserved gut barrier function and exhibited less-pronounced gut toxicity in comparison with patients with more severe acute GVHD. In this study, the intestinal barrier permeability and intestinal toxicity were the only factors significantly predicting acute GVHD severity, underlining the importance of gut barrier disruption for the development of GVHD [23].

### 3. Gut Barrier Preservation and Restoration in allo-HCT

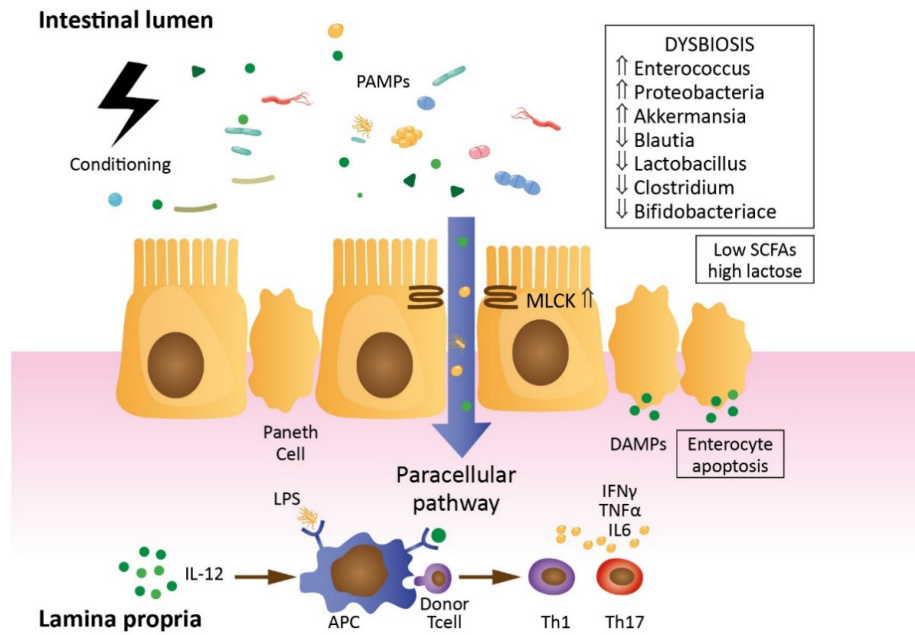
GVHD remains the major complication of allo-HCT, worsening the outcomes of its recipients. Previous studies of inflammatory pathways involved in GVHD development in animals showed that the gastrointestinal tract is not only the major target organ but, also, the place of the GVHD initiation and propagation [31–35]. Studies have shown that intestinal barrier damage during transplantation results in increased permeability and, hence, increased intestinal PAMPs translocation and the production of proinflammatory cytokines, which causes a “cytokine storm”, along with the activation of alloreactive T lymphocytes [36] (Figure 2). The means of GVHD prevention are the enhancement of the GI mucosal barrier structure (including microbiome) and restoration of the barrier function altered by the conditioning.

#### 3.1. Vitamin A

Recently, free serum vitamin A levels were tested in a cohort study of 114 consecutive pediatric patients undergoing allo-HCT. Lower vitamin A levels after transplantation were associated with a higher rate of GI GVHD, along with TRM at 1 year [37]. In the gut, dendritic cells metabolize vitamin A into retinoic acid (RA). RA promotes the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and immunoglobulin A antibody-secreting cells [38] and the secretion of interleukin 22 (IL-22), which supports epithelial cell proliferation, TJ functions and mucus production by goblet cells [39]. Studies to evaluate the benefits of vitamin A supplementation on the intestinal barrier integrity in allo-HCT are required.

#### 3.2. MLCK Inhibition

In vitro and animal studies have identified myosin light-chain kinase (MLCK210) as a major regulator of tight junction functions. An increase in MLCK210 expression was associated with impaired barrier functions in lung injury models, and a treatment with the MLCK inhibitor resulted in protection against lung injury [40,41]. Recently, Nalle et al. investigated MLCK210 in the animal GVHD model. MLCK210-deficient mice did not experience epithelial barrier loss and showed less GVHD propagation, marked by reduced histopathology, fewer CD8<sup>+</sup> effector T cells in the gut and improved overall survival [42]. All this data place MLCK as a target for a therapeutical approach in GVHD treatment beyond immunosuppression.



**Figure 2.** Intestinal barrier disruption after allo-HCT. Pretransplant conditioning results in enterocyte and Paneth cells apoptosis, leading to lower lactase and higher lactose concentrations and dysbiosis with the *Enterococcus* genus domination associated with lower SCFA concentrations. An increased MLCK expression results in loosening of the tight junctions and PAMPs translocation into the lamina propria. PAMPs (e.g., LPS) and DAMPs from damaged cells activate APCs. It results in donor T-cell activation, proinflammatory cytokines, i.e., IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5 release and GVHD. SCFAs, short-chain fatty acids, MLCK, myosin light chain kinase, PAMPs, pathogen-associated molecular patterns, LPS, lipopolysaccharide, DAMPs, damage-associated molecular patterns, APC, antigen-presenting cell, IFN- $\gamma$ , interferon gamma, TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha, IL-5, interleukin 5 and GVHD, graft-versus-host disease.

### 3.3. Indole Derivatives

As mentioned above, indole derivatives are exerting protective functions towards the intestinal epithelial barrier. It was shown that the treatment with indole-3-carboxaldehyde (ICA) limited the epithelial damage associated with conditioning, bacterial translocation and inflammation, reducing GVHD-related mortality in a murine model [43]. Further studies on ICA as the prophylaxis against GVHD are needed.

### 3.4. Alloantigen Presentation Inhibition in the Gut via IL-12 Neutralization

The initiation of GVHD starts with the interactions between recipient antigen-presenting cells (APCs) and donor T cells. It is well-known that not only hematopoietic host APCs but, also, nonhematopoietic (“nonprofessional”) APCs like fibroblasts or endothelial cells can also initiate MHC-II-dependent responses [44,45]. A recent paper from Koyama et al. showed that intestinal microflora stimulates MHC-II expression in intestinal epithelial cells and that this process is further enhanced after the start of conditioning therapy. It was also shown that MHC-II presentation by IECs is necessary for CD4+ T-cell-mediated GI GVHD. The pretransplant neutralization of IL-12 prevented the MHC-II expression on IECs and mitigated GI GVHD in mice [46]. The IL-12 blocking antibody is already used in humans for the treatment of inflammatory bowel disease, plaque psoriasis and psoriatic arthritis and has shown promising results in blocking Th1/Th17 responses after allo-HCT, as demonstrated in a small trial that was not powered for clinical benefit [47].



### 3.9. Fecal Microbiota Transplantation

Fecal microbiota transplantation (FMT) is a procedure of administration of fecal preparation from a healthy donor into a recipient with the intent of repopulating the patient's microbiome with diverse microorganisms. Fecal microbiota transplantation in patients with various hematological malignancies colonized with antibiotic-resistant bacteria (ARB) led to the complete eradication of ARB in 75% of recipients [64] and 70% in the case when FMT was performed in a study of 10 patients before or after allo-HCT [65]. The ODYSSEE study investigated the use of autologous FMT in 62 acute myeloid leukemia (AML) patients during induction chemotherapy. In this setting, FMT managed to restore the patients' diverse microbiome, as well as decrease the antibiotic resistance gene carriage and reduce the intestinal inflammation [66]. In the allo-HCT setting, two case series reporting its utility in recurrent *Clostridium difficile* infection in the posttransplant period were published. No serious adverse effects were noted, and a high efficacy was observed [67,68]. Several case series and pilot studies were investigating FMT safety and efficacy in steroid-refractory gastrointestinal aGVHD. No adverse side effects were reported, and the majority of the patients experienced the clinical benefit of various ranges [69–73]. A prospective trial on FMT efficacy in ARB decolonization and GVHD management in 13 patients with GVHD (11 aGVHD and 2 cGVHD) proved FMT to be an important approach in this setting. In 71% of cases, FMT resulted in the decolonization of at least one ARB. In the case of aGVHD, the overall response rate was 57%, including complete remission in 42% of the procedures. Both patients with cGVHD benefited clinically by stabilization or disease control improvement [74]. Fecal microbiota transplantation, in order to reinduce microbial diversity in the posttransplant period, was studied in a pilot study of 13 patients undergoing allo-HCT. The procedure was well-tolerated and resulted in increased microbiome diversity measured with urinary 3-IS and stool 16S ribosomal sequencing [75]. Autologous FMT offered to 14 allo-HCT recipients resulted in the patients' microbial diversity restoration compared to the controls that did not undergo the treatment [76]. Fecal microbiota transplantation remains a potential tool to restore the microbiome diversity lost in the post-allo-HCT period. Several clinical trials investigating FMT safety and efficacy in the allo-HCT setting are currently ongoing (NCT04059757, NCT03812705, NCT04285424, NCT04280471, NCT03819803 and NCT04269850).

### 4. Conclusions

Many studies support the hypothesis that an injury to the intestinal mucosa, resulting in increased intestinal barrier permeability, along with microbiota diversity loss, is associated with GVHD initiation and propagation and worse allo-HCT recipient outcomes. To date, there is no perfect way to analyze the gut permeability in HCT recipients; the most commonly used permeability assays like SAT fail to distinguish between increased tight junction permeability and epithelial cell damage. Biomarkers like citrulline or REG3 mirrors the mucosal damage extent rather than increased intestinal permeability. Additionally, most data on intestinal barrier damage importance in GVHD development come from in vitro and animal models that differ substantially from clinical settings. Currently, there is no guideline for routine intestinal barrier protection in allo-HCT. New hopes are raised with dietary interventions (prebiotics, vitamin A and lactose-free nutrition) and novel therapeutic strategies like butyrate or indole derivate supplementation and FMT. Well-designed and, ideally, multicenter studies on safety and efficacy will hopefully provide the evidence needed to determine the best practices in intestinal barrier damage prevention.

**Author Contributions:** M.T. collected the literature and wrote the manuscript, J.B. and G.W.B. reviewed the manuscript and made critical revisions. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This paper was financed by the Polish National Science Center (competition PRELUDIUM 15, 2018/29/N/NZ5/01779).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

### 3.9. Fecal Microbiota Transplantation

Fecal microbiota transplantation (FMT) is a procedure of administration of fecal preparation from a healthy donor into a recipient with the intent of repopulating the patient's microbiome with diverse microorganisms. Fecal microbiota transplantation in patients with various hematological malignancies colonized with antibiotic-resistant bacteria (ARB) led to the complete eradication of ARB in 75% of recipients [64] and 70% in the case when FMT was performed in a study of 10 patients before or after allo-HCT [65]. The ODYSSEE study investigated the use of autologous FMT in 62 acute myeloid leukemia (AML) patients during induction chemotherapy. In this setting, FMT managed to restore the patients' diverse microbiome, as well as decrease the antibiotic resistance gene carriage and reduce the intestinal inflammation [66]. In the allo-HCT setting, two case series reporting its utility in recurrent *Clostridium difficile* infection in the posttransplant period were published. No serious adverse effects were noted, and a high efficacy was observed [67,68]. Several case series and pilot studies were investigating FMT safety and efficacy in steroid-refractory gastrointestinal aGVHD. No adverse side effects were reported, and the majority of the patients experienced the clinical benefit of various ranges [69–73]. A prospective trial on FMT efficacy in ARB decolonization and GVHD management in 13 patients with GVHD (11 aGVHD and 2 cGVHD) proved FMT to be an important approach in this setting. In 71% of cases, FMT resulted in the decolonization of at least one ARB. In the case of aGVHD, the overall response rate was 57%, including complete remission in 42% of the procedures. Both patients with cGVHD benefited clinically by stabilization or disease control improvement [74]. Fecal microbiota transplantation, in order to reinduce microbial diversity in the posttransplant period, was studied in a pilot study of 13 patients undergoing allo-HCT. The procedure was well-tolerated and resulted in increased microbiome diversity measured with urinary 3-IS and stool 16S ribosomal sequencing [75]. Autologous FMT offered to 14 allo-HCT recipients resulted in the patients' microbial diversity restoration compared to the controls that did not undergo the treatment [76]. Fecal microbiota transplantation remains a potential tool to restore the microbiome diversity lost in the post-allo-HCT period. Several clinical trials investigating FMT safety and efficacy in the allo-HCT setting are currently ongoing (NCT04059757, NCT03812705, NCT04285424, NCT04280471, NCT03819803 and NCT04269850).

### 4. Conclusions

Many studies support the hypothesis that an injury to the intestinal mucosa, resulting in increased intestinal barrier permeability, along with microbiota diversity loss, is associated with GVHD initiation and propagation and worse allo-HCT recipient outcomes. To date, there is no perfect way to analyze the gut permeability in HCT recipients; the most commonly used permeability assays like SAT fail to distinguish between increased tight junction permeability and epithelial cell damage. Biomarkers like citrulline or REG3 mirrors the mucosal damage extent rather than increased intestinal permeability. Additionally, most data on intestinal barrier damage importance in GVHD development come from in vitro and animal models that differ substantially from clinical settings. Currently, there is no guideline for routine intestinal barrier protection in allo-HCT. New hopes are raised with dietary interventions (prebiotics, vitamin A and lactose-free nutrition) and novel therapeutic strategies like butyrate or indole derivate supplementation and FMT. Well-designed and, ideally, multicenter studies on safety and efficacy will hopefully provide the evidence needed to determine the best practices in intestinal barrier damage prevention.

**Author Contributions:** M.T. collected the literature and wrote the manuscript, J.B. and G.W.B. reviewed the manuscript and made critical revisions. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This paper was financed by the Polish National Science Center (competition PRELUDIUM 15, 2018/29/N/NZ5/01779).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** G.W.B. and J.B. are the owners of the Human Biome Institute that provides the means for the FMT procedures.

## References

- Cooke, K.R.; Gerbitz, A.; Crawford, J.M.; Teshima, T.; Hill, G.R.; Tesolin, A.; Rossignol, D.P.; Ferrara, J.L. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107*, 1581–1589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Peled, J.U.; Gomes, A.L.; Devlin, S.M.; Littmann, E.R.; Taur, Y.; Sung, A.D.; Weber, D.; Hashimoto, D.; Slingerland, A.E.; Slingerland, J.B.; et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 822–834. [[CrossRef](#)]
- Scaldaferri, F.; Pizzoferrato, M.; Gerardi, V.; Lopetuso, L.; Gasbarrini, A. The gut barrier: New acquisitions and therapeutic approaches. *J. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *46*, S12–S17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vancomelbeke, M.; Vermeire, S. The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *11*, 821–834. [[CrossRef](#)]
- Hartsock, A.; Nelson, W.J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 660–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ungewiß, H.; Vielmuth, F.; Suzuki, S.T.; Maiser, A.; Harz, H.; Leonhardt, H.; Kugelmann, D.; Schlegel, N.; Waschke, J. Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Romero, E.S.; Cotoner, C.A.; Camacho, C.P.; Bedmar, M.C.; Vicario, M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2015**, *107*, 686–696.
- Poyet, M.; Groussin, M.; Gibbons, S.M.; Avila-Pacheco, J.; Jiang, X.; Kearney, S.M.; Perrotta, A.R.; Berdy, B.; Zhao, S.; Lieberman, T.D.; et al. A library of human gut bacterial isolates paired with longitudinal multiomics data enables mechanistic microbiome research. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1442–1452. [[CrossRef](#)]
- Muniz, L.R.; Knosp, C.; Yeretssian, G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 310. [[CrossRef](#)]
- Sorbara, M.T.; Pamer, E.G. Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Bischoff, S.C.; Barbara, G.; Buurman, W.; Ockhuizen, T.; Schulzke, J.D.; Serino, M.; Tilg, H.; Watson, A.; Wells, J.M. Intestinal permeability—A new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* **2014**, *14*, 189. [[CrossRef](#)]
- Furusawa, Y.; Obata, Y.; Fukuda, S.; Endo, T.A.; Nakato, G.; Takahashi, D.; Nakanishi, Y.; Uetake, C.; Kato, K.; Kato, T.; et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **2013**, *504*, 446–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Belkaid, Y.; Harrison, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* **2017**, *46*, 562–576, ISSN 1074-7613. [[CrossRef](#)]
- Gordon, J.; M’Leod, J.W. Inhibition of bacterial growth by some amino acids and its bearing on the use of tryptic digests as culture media. *J. Pathol. Bacteriol.* **1926**, *29*, 13–25. [[CrossRef](#)]
- Zelante, T.; Iannitti, R.G.; Cunha, C.; De Luca, A.; Giovannini, G.; Pieraccini, G.; Zecchi, R.; D’Angelo, C.; Massi-Benedetti, C.; Fallarino, F.; et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **2013**, *39*, 372–385. [[CrossRef](#)]
- Bansal, T.; Alaniz, R.C.; Wood, T.K.; Jayaraman, A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 228–233. [[CrossRef](#)]
- Menard, S.; Cerf-Bensussan, N.; Heyman, M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* **2010**, *3*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rapoport, A.P.; Watelet, L.F.M.; Linder, T.; Rberly, S.; Raubertas, R.F.; Lipp, J.; Duerst, R.; Abboud, C.N.; Constine, L.; Andrews, J.; et al. Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2446–2453. [[CrossRef](#)]
- Johansson, J.E.; Ekman, T. Gastro-intestinal toxicity related to bone marrow transplantation: Disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. *Bone Marrow Transplant.* **1997**, *19*, 921–925. [[CrossRef](#)]
- Johansson, J.E.; Brune, M.; Ekman, T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* **2001**, *28*, 737–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blijlevens, N.M.A.; Donnelly, J.P.; M’Rabet, L.; De Pauw, B.E.; Land, B.V. Measuring mucosal damage induced by cytotoxic therapy. *Support. Care Cancer* **2004**, *12*, 227–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blijlevens, N.; Donnelly, J.; de Pauw, B. Prospective evaluation of gut mucosal barrier injury following various myeloablative regimens for haematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* **2005**, *35*, 707–711. [[CrossRef](#)]
- Johansson, J.E.; Ekman, T. Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft-versus-host disease severity in patients. *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 2340–2345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Bates, D.W.; Parsonnet, J.; Ketchum, P.A.; Miller, E.B.; Novitsky, T.J.; Sands, K.; Hibberd, P.L.; Graman, P.S.; Lanken, P.N.; Schwartz, J.S.; et al. Limulus amoebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome: AMCC sepsis project working group. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *27*, 582–591. [[CrossRef](#)]
25. Strutz, F.; Heller, G.; Krasemann, K.; Krone, B.; Müller, G.A. Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med.* **1999**, *25*, 435–444. [[CrossRef](#)]
26. Blijlevens, N.M.; Lutgens, L.C.H.W.; Schattenberg, A.V.M.B.; Donnelly, J.P. Citrulline: A potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant.* **2004**, *34*, 193–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Crenn, P.; Coudray-Lucas, C.; Thuillier, F.; Cynober, L.; Messing, B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 1496–1505. [[CrossRef](#)]
28. Vreugdenhil, A.C.; Wolters, V.M.; Adriaanse, M.P.; van den Neucker, A.M.; van Bijnen, A.A.; Houwen, R.; Buurman, W.A. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand. J. Gastroenterol.* **2011**, *46*, 1435–1441. [[CrossRef](#)]
29. Prasad, S.; Mingrino, R.; Kaukinen, K.; Hayes, K.; Powell, R.; MacDonald, T.; Collins, J. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Investig.* **2005**, *85*, 1139–1162. [[CrossRef](#)]
30. Blijlevens, N.M.; Donnelly, J.P.; DePauw, B.E. Inflammatory response to mucosal barrier injury after myeloablative therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **2005**, *36*, 703–707. [[CrossRef](#)]
31. Hill, G.R.; Crawford, J.M.; Cooke, K.R.; Brinson, Y.S.; Pan, L.; Ferrara, J.L. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* **1997**, *90*, 3204–3213. [[CrossRef](#)]
32. Hill, G.R.; Ferrara, J.L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: Rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **2000**, *95*, 2754–2759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nalle, S.C.; Turner, J.R. Endothelial and epithelial barriers in graft-versus-host disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *763*, 105–131. [[PubMed](#)]
34. Noth, R.; Lange-Grumfeld, J.; Stüber, E.; Kruse, M.-L.; Ellrichmann, M.; Häsler, R.; Hampe, J.; Bewig, B.; Rosenstiel, P.; Schreiber, S.; et al. Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model. *BMC Gastroenterol.* **2011**, *11*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Nalle, S.C.; Kwak, H.A.; Edelblum, K.L.; Joseph, N.E.; Singh, G.; Khramtsova, G.F.; Mortenson, E.D.; Savage, P.A.; Turner, J.R. Recipient NK cell inactivation and intestinal barrier loss are required for MHC-matched graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 243ra87. [[CrossRef](#)]
36. Penack, O.; Holler, E.; van den Brink, M.R. Graft-versus-host disease: Regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* **2010**, *115*, 1865–1872. [[CrossRef](#)]
37. Louder, D.T.; Khandelwal, P.; Dandoy, C.; Jodele, S.; Grimley, M.S.; Wallace, G.; Lane, A.; Taggart, C.; Teusink-Cross, A.C.; Lake, K.E.; et al. Lower levels of vitamin A are associated with increased gastrointestinal graft-versus-host disease in children. *Blood* **2017**, *129*, 2801–2807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Qiang, Y.; Xu, J.; Yan, C.; Jin, H.; Xiao, T.; Yan, N.; Zhou, L.; An, H.; Zhou, X.; Shao, Q.; et al. Butyrate and retinoic acid imprint mucosal-like dendritic cell development synergistically from bone marrow cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2017**, *189*, 290–297. [[CrossRef](#)]
39. Martin, J.C.; Bériou, G.; Heslan, M.; Bossard, C.; Jarry, A.; Abidi, A.; Hulin, P.; Ménoret, S.; Thinard, R.; Anegon, I.; et al. IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol.* **2016**, *9*, 539–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Rossi, J.L.; Velentza, A.V.; Steinhorn, D.M.; Watterson, D.M.; Wainwright, M.S. MLCK210 gene knockout or kinase inhibition preserves lung function following endotoxin-induced lung injury in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2007**, *292*, L1327–L1334. [[CrossRef](#)]
41. Parker, J. Inhibitors of myosin light chain kinase and phosphodiesterase reduce ventilator-induced lung injury. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *89*, 2241–2248. [[CrossRef](#)]
42. Nalle, S.C.; Zuo, L.; Ong, M.L.D.M.; Singh, G.; Worthylake, A.M.; Choi, W.; Manresa, M.C.; Southworth, A.P.; Edelblum, K.L.; Baker, G.J.; et al. Graft-versus-host disease propagation depends on increased intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 902–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Swimm, A.; Giver, C.R.; DeFilipp, Z.; Rangaraju, S.; Sharma, A.; Antonova, A.U.; Sonowal, R.; Capaldo, C.; Powell, D.; Qayed, M.; et al. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. *Blood* **2018**, *132*, 2506–2519. [[CrossRef](#)]
44. Londei, M.; Lamb, J.R.; Bottazzo, G.F.; Feldmann, M. Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature* **1984**, *312*, 639–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. MacDonald, G.B.; Jewell, D.P. Class II antigen (HLA-DR) expression by intestinal epithelial cells in inflammatory diseases of colon. *J. Clin. Pathol.* **1987**, *40*, 312–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Koyama, M.; Mukhopadhyay, P.; Schuster, I.S.; Henden, A.S.; Hülsdünker, J.; Varelias, A.; Vetizou, M.; Kuns, R.D.; Robb, R.J.; Zhang, P.; et al. MHC Class II Antigen Presentation by the Intestinal Epithelium Initiates Graft-versus-Host Disease and Is Influenced by the Microbiota. *Immun.* **2019**, *51*, 885–898.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Pidala, J.; Beato, F.; Kim, J.; Betts, B.; Jim, H.; Sagatys, E.; Levine, J.E.; Ferrara, J.L.; Ozbek, U.; Ayala, E.; et al. In vivo IL-12/IL-23p40 neutralization blocks Th1/Th17 response after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematol.* **2017**, *103*, 531–539. [[CrossRef](#)]
48. Zhao, D.; Kim, Y.H.; Jeong, S.; Greenson, J.K.; Chaudhry, M.S.; Hoepfing, M.; Anderson, E.R.; van den Brink, M.R.; Peled, J.U.; Gomes, A.L.; et al. Survival signal REG3 $\alpha$  prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 4970–4979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hanash, A.M.; Dudakov, J.A.; Hua, G.; O'Connor, M.H.; Young, L.F.; Singer, N.V.; West, M.L.; Jenq, R.R.; Holland, A.M.; Kappel, L.W.; et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **2012**, *37*, 339–350. [[CrossRef](#)]
50. Bajic, D.; Niemann, A.; Hillmer, A.K.; Mejias-Luque, R.; Bluemel, S.; Docampo, M.; Funk, M.C.; Tonin, E.; Boutros, M.; Schnabl, B.; et al. Gut microbiota-derived propionate regulates the expression of reg3 mucosal lectins and ameliorates experimental colitis in mice. *J. Crohns Colitis* **2020**, *14*, 1462–1472. [[CrossRef](#)]
51. Ferrara, J.L.M.; Harris, A.C.; Greenson, J.K.; Braun, T.M.; Holler, E.; Teshima, T.; Levine, J.E.; Choi, S.W.J.; Huber, E.; Landfried, K.; et al. Regenerating islet-derived 3- $\alpha$  is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* **2011**, *118*, 6702–6708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Levine, J.E.; Huber, E.; Hammer, S.T.; Harris, A.C.; Greenson, J.K.; Braun, T.M.; Ferrara, J.L.; Holler, E. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood* **2013**, *122*, 1505–1509. [[CrossRef](#)]
53. Brandl, K.; Plitas, G.; Mihu, C.N.; Ubeda, C.; Jia, T.; Fleisher, M.; Schnabl, B.; DeMatteo, R.P.; Pamer, E.G. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* **2008**, *455*, 804–807. [[CrossRef](#)]
54. Mathewson, N.D.; Jenq, R.; Mathew, A.; Koenigsnecht, M.; Hanash, A.; Toubai, T.; Oravec-Wilson, K.; Wu, S.-R.; Sun, Y.; Rossi, C.; et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 505–513. [[CrossRef](#)]
55. Markey, K.A.; Schluter, J.; Gomes, A.L.C.; Littmann, E.R.; Pickard, A.J.; Taylor, B.P.; Giardina, P.A.; Weber, D.; Dai, A.; Docampo, M.D.; et al. The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD. *Blood* **2020**, *136*, 130–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Haak, B.W.; Littmann, E.R.; Chaubard, J.-L.; Pickard, A.; Fontana, E.; Adhi, F.; Gyaltsen, Y.; Ling, L.; Morjaria, S.M.; Peled, J.U.; et al. Impact of gut colonization with butyrate producing microbiota on respiratory viral infection following allo-HCT. *Blood* **2018**, *131*, 2978–2986. [[CrossRef](#)]
57. Galloway-Peña, J.R.; Peterson, C.B.; Malik, F.; Sahasrabhojane, P.V.; Shah, D.P.; E Brumlow, C.; Carlin, L.G.; Chemaly, R.F.; Im, J.S.; Rondon, G.; et al. Fecal Microbiome, Metabolites, and Stem Cell Transplant Outcomes: A Single-Center Pilot Study. *Open Forum Infect. Dis.* **2019**, *6*, 173. [[CrossRef](#)]
58. Yoshifuji, K.; Inamoto, K.; Kiridoshi, Y.; Takeshita, K.; Sasajima, S.; Shiraiishi, Y.; Yamashita, Y.; Nisaka, Y.; Ogura, Y.; Takeuchi, R.; et al. Prebiotics protect against acute graft-versus-host disease and preserve the gut microbiota in stem cell transplantation. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 4607–4617. [[CrossRef](#)]
59. Holler, E.; Butzhammer, P.; Schmid, K.; Hundsrucker, C.; Koestler, J.; Peter, K.; Zhu, W.; Sporrer, D.; Hehlgers, T.; Kreutz, M.; et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: Loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2014**, *20*, 640–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Taur, Y.; Jenq, R.; Perales, M.-A.; Littmann, E.R.; Morjaria, S.; Ling, L.; No, D.; Gobourne, A.; Viale, A.; Dahi, P.; et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2014**, *124*, 1174–1182. [[CrossRef](#)]
61. Montassier, E.; Batard, E.; Massart, S.; Gastinne, T.; Carton, T.; Caillon, J.; Le Fresne, S.; Caroff, N.; Hardouin, J.B.; Moreau, P.; et al. 16S rRNA Gene Pyrosequencing Reveals Shift in Patient Faecal Microbiota During High-Dose Chemotherapy as Conditioning Regimen for Bone Marrow Transplantation. *Microb. Ecol.* **2014**, *67*, 690–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Weber, D.; Oefner, P.J.; Hiergeist, A.; Koestler, J.; Gessner, A.; Weber, M.; Hahn, J.; Wolff, D.; Stämmler, F.; Spang, R.; et al. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood* **2015**, *126*, 1723–1728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Stein-Thoeringer, C.K.; Nichols, K.B.; Lazrak, A.; Docampo, M.D.; Slingerland, A.E.; Slingerland, J.B.; Clurman, A.G.; Armijo, G.; Gomes, A.L.C.; Shono, Y.; et al. Lactose drives Enterococcus expansion to promote graft-versus-host disease. *Science* **2019**, *366*, 1143–1149. [[CrossRef](#)]
64. Bilinski, J.; Grzesiowski, P.; Sorensen, N.; Madry, K.; Muszynski, J.; Robak, K.; Wroblewska, M.; Dzieciatkowski, T.; Dulny, G.; Dwilewicz-Trojaczek, J.; et al. Fecal microbiota transplantation in patients with blood disorders inhibits gut colonization with antibiotic-resistant bacteria: Results of a prospective, single-center study. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, 364–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Battipaglia, G.; Malard, F.; Rubio, M.T.; Ruggeri, A.; Mamez, A.C.; Brissot, E.; Giannotti, F.; Dulery, R.; Joly, A.C.; Baylatry, M.T.; et al. Fecal microbiota transplantation before or after allogeneic hematopoietic transplantation in patients with hematologic malignancies carrying multidrug-resistance bacteria. *Haematologica* **2019**, *104*, 1682–1688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Mohty, M.; Malard, F.; Vekhoff, A.; Lapusan, S.; Isnard, F.; D'Incan, E.; Rey, J.; Saillard, C.; Thomas, X.; Ducastelle-Lepretre, S.; et al. The Odyssee study: Prevention of dysbiosis complications with autologous Fecal Microbiota Transfer (FMT) in Acute

- Myeloid Leukemia (AML) patients undergoing intensive treatment: Results of a prospective multicenter trial. *Blood* **2018**, *132* (Suppl. S1), 1444. [\[CrossRef\]](#)
67. Webb, B.J.; Brunner, A.; Ford, C.D.; Gazdik, M.A.; Petersen, F.B.; Hoda, D. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **2016**, *18*, 628–633. [\[CrossRef\]](#)
  68. Moss, E.L.; Falconer, S.B.; Tkachenko, E.; Wang, M.; Systrom, H.; Mahabamunuge, J.; Relman, D.A.; Hohmann, E.L.; Bhatt, A.S. Long-term taxonomic and functional divergence from donor bacterial strains following fecal microbiota transplantation in immunocompromised patients. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182585. [\[CrossRef\]](#)
  69. Mao, D.; Jiang, Q.; Sun, Y.; Mao, Y.; Guo, L.; Zhang, Y.; Man, M.; Ouyang, G.; Sheng, L. Treatment of intestinal graft-versus-host disease with unrelated donor fecal microbiota transplantation capsules: A case report. *Medicine* **2020**, *99*, e22129. [\[CrossRef\]](#)
  70. Kakihana, K.; Fujioka, Y.; Suda, W.; Najima, Y.; Kuwata, G.; Sasajima, S.; Mimura, I.; Morita, H.; Sugiyama, D.; Nishikawa, H.; et al. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood* **2016**, *128*, 2083–2088. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
  71. Spindelboeck, W.; Schulz, E.; Uhl, B.; Kashofer, K.; Aigelsreiter, A.; Zinke-Cerwenka, W.; Mulabecirovic, A.; Kump, P.K.; Halwachs, B.; Gorkiewicz, G.; et al. Repeated fecal microbiota transplantations attenuate diarrhea and lead to sustained changes in the fecal microbiota in acute, refractory gastrointestinal graft-versus-host-disease. *Haematologica* **2017**, *102*, e210–e213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
  72. Qi, X.; Li, X.; Zhao, Y.; Wu, X.; Chen, F.; Ma, X.; Zhang, F.; Wu, D. Treating steroid refractory intestinal acute graft-vs.-host disease with fecal microbiota transplantation: A pilot study. *Front Immunol.* **2018**, *9*, 2195. [\[CrossRef\]](#)
  73. Van Lier, Y.F.; Davids, M.; Haverkate, N.J.E.; de Groot, P.F.; Donker, M.L.; Meijer, E.; Heubel-Moenen, F.C.J.I.; Nur, E.; Zeerleder, S.S.; Nieuwdorp, M.; et al. Donor fecal microbiota transplantation ameliorates intestinal graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaaz8926. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
  74. Bilinski, J.; Lis, K.; Tomaszewska, A.; Grzesiowski, P.; Dzieciatkowski, T.; Tyszka, M.; Karakulska-Prystupiuk, E.; Boguradzki, P.; Tormanowska, M.; Halaburda, K.; et al. Fecal microbiota transplantation in patients with acute and chronic graft-versus-host disease—Spectrum of responses and safety profile. Results from a prospective, multicenter study. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, E88–E91. [\[CrossRef\]](#)
  75. DeFilipp, Z.; Peled, J.U.; Li, S.; Mahabamunuge, J.; Dagher, Z.; Slingerland, A.E.; del Rio, C.; Valles, B.; Kempner, M.E.; Smith, M.; et al. Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 745–753. [\[CrossRef\]](#)
  76. Taur, Y.; Coyte, K.; Schluter, J.; Robiloti, E.; Figueroa, C.; Gjonbalaj, M.; Littmann, E.R.; Ling, L.; Miller, L.; Gyaltsen, Y.; et al. Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaap9489. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



Article

# Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients

Martyna Tyszka <sup>1,\*</sup>, Dominika Maciejewska-Markiewicz <sup>2,\*</sup>, Jarosław Biliński <sup>1</sup>, Arkadiusz Lubas <sup>3</sup>, Ewa Stachowska <sup>2</sup> and Grzegorz W. Basak <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Hematology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland  
<sup>2</sup> Department of Human Nutrition and Metabolomics, Pomeranian Medical University, 71-460 Szczecin, Poland  
<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Nephrology and Dialysis, Military Institute of Medicine, 04-141 Warsaw, Poland  
\* Correspondence: mtyszka@wum.edu.pl (M.T.); dmaciejewska.pum@gmail.com (D.M.-M.)



**Citation:** Tyszka, M.; Maciejewska-Markiewicz, D.; Biliński, J.; Lubas, A.; Stachowska, E.; Basak, G.W. Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15962. <https://doi.org/10.3390/ijms232415962>

Academic Editors: Eleni Gavrilaki and Ioanna Sakellari

Received: 9 November 2022  
Accepted: 12 December 2022  
Published: 15 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Significant progress has been made in understanding the connection between intestinal barrier function and allogenic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) recipients' outcomes. The purpose of this study was to further evaluate gut barrier permeability and other potential intestinal barrier disruption markers in the allo-HCT setting. Fifty-one patients were enrolled in the study. Intestinal permeability was assessed with the sugar absorption test and faecal concentrations of the zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 levels in the peri-transplantation period. Most patients undergoing allo-HCT in our department had a disrupted intestinal barrier at the baseline, which was associated with older age and higher Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index (HCT-CI). Regardless of this, we observed a further increase in gut barrier permeability after allo-HCT in most patients. However, there was no association between permeability assay and other markers (zonulin, calprotectin and beta-defensin-2). Patients with acute GVHD had significantly higher median calprotectin concentrations after allo-HCT compared with the patients without this complication. Our findings indicate that gut barrier damage develops prior to allo-HCT with progression after the procedure and precedes further complications, but did not prove other markers to be useful surrogates of intestinal permeability.

**Keywords:** intestinal barrier; gut permeability; allogeneic hematopoietic cell transplantation; graft-versus-host disease

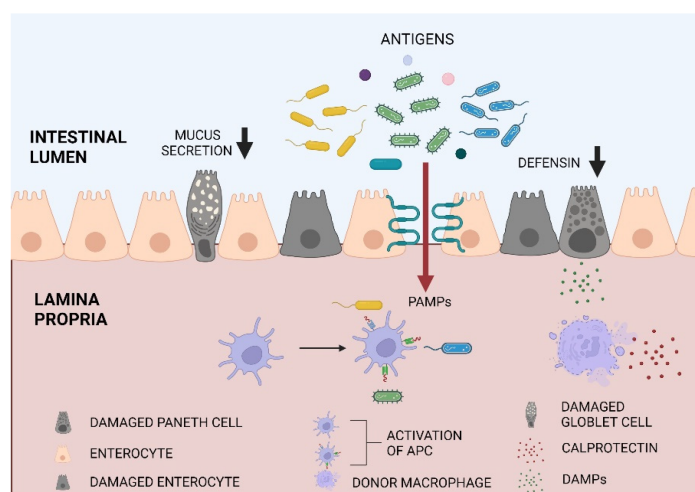
## 1. Introduction

Allogenic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) remains the only curative option for many hematological malignancies and other diseases, but its application is limited due to the risk of life-threatening complications, mainly graft-versus-host disease (GVHD) and infections. In the past few decades, there has been a tremendous growth in interest regarding the connection between intestinal barrier function and allo-HCT recipients' outcomes [1–8]. The intestinal epithelial barrier is a complex molecular communication machinery that allows nutrient absorption and the selective transfer of various molecules across the intestinal wall and protects against harmful toxins translocation into the body fluids. It is regulated by a complicated interplay between epithelial cells, intestinal microbiota, the immune system and the enteric nervous system [9].

Gastrointestinal toxicity is carefully observed in the posttransplant clinical setting. Practically oral mucositis was evaluated with a World Health Organization (WHO) score [10]. Intestinal permeability after allo-HCT is only a subject of clinical research. It is most commonly measured as a ratio between urinary excretion of various ingested probes compared

to the control—mainly with the  $^{51}\text{CrEDTA}$  absorption test or sugar absorption test (SAT). Few studies evaluating intestinal barrier function after allo-HCT have documented that gut permeability increases significantly after transplantation. It was also observed that the peri-transplant increase in intestinal permeability anticipates the occurrence of mucositis but does not strictly correspond with it. Hence, it may be misleading to estimate the intestinal injury on the extent of oral mucositis in the same patient [11–14].

Most evidence on intestinal barrier importance in the allo-HCT setting was seen in the GVHD development [3–6]. Conditioning chemotherapy leads to the disruption of the intestinal barrier and increases its permeability. It allows pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) translocation to the lamina propria and faulty activation of the gut's wall immune system, promoting GVHD initiation [15], as shown schematically in Figure 1. A study assessing intestinal permeability after allo-HCT with  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  absorption test confirmed that patients with preserved intestinal barrier function ('normal' permeability) experienced less gut toxicity and mild acute GVHD (aGVHD) compared to those with increased permeability [14]. The authors stressed that among other characteristics related to the patient or transplant procedure, the intestinal barrier permeability and intestinal toxicity were the only factors significantly correlating with the severity of aGVHD [14]. In another study, it was proven that a proper intestinal barrier expressed as preserved microbial diversity was associated with significantly lower mortality after allo-HCT [16].



**Figure 1.** Intestinal barrier disruption after allo-HCT. Pre-transplant conditioning results in enterocyte, goblet cells and Paneth cells apoptosis. Increased MLCK expression results in loosening of the tight junctions and PAMPs translocation into the lamina propria. PAMPs (e.g., LPS) and DAMPs from damaged cells activate APCs. It results in donor T cell activation, pro-inflammatory cytokines i.e.,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-5}$  release and GVHD initiation. This figure was created with BioRender.

MLCK; myosin light chain kinase, PAMPs; pathogen-associated molecular patterns, LPS; lipopolysaccharide, DAMPs; damage-associated molecular patterns, APC; antigen-presenting cell,  $\text{IFN-}\gamma$ ; interferon gamma,  $\text{TNF-}\alpha$ ; tumor necrosis factor alpha,  $\text{IL-5}$ ; interleukin 5, GVHD; graft-versus-host disease.

Other tools for intestinal barrier disruption and increased permeability evaluation are biomarkers assessed in urine, serum or stool. Those particles can be divided into bacteria-related molecules such as lipopolysaccharide (LPS) [17] and circulating endotoxin core antibodies (EndoCAb) [18], or direct intestinal barrier damage markers such as citrulline produced by small intestinal enterocytes [19,20], fatty acid-binding proteins (FABPs) [21], tight junctions proteins—claudins [22] or calprotectin—a sensitive marker for mucosal inflammation of the intestine [23]. It was recently observed that in patients with confirmed



gastrointestinal aGVHD, the density of donor-calprotectin-expressing colonic mucosal macrophages was significantly increased compared to the patients without aGVHD, again stressing that inflammation at the level of the intestinal wall is strictly associated with aGVHD development [24]. Zonulin is another recently discovered intestinal permeability marker. It is believed to act in a similar mode to the Zonula occludens toxin produced by *Vibrio cholerae*, relaxing enterocytes' tight junctions (TJs) and increasing paracellular transport via the intestinal wall [25,26]. Zonulin is overexpressed in autoimmune diseases where TJ dysfunction plays a pivotal role, such as celiac disease and type 1 diabetes [25]. Since the discovery of zonulin by Fasano in 2000, this protein has been used as a biomarker of several immune-mediated diseases, including autoimmune diseases, malignancies and neuro-inflammatory diseases [27]. Another peptide involved in gut barrier preservation is beta-defensin-2, which is believed to promote cell proliferation, anti-inflammatory responses and intestinal barrier's TJs formation and restoration [28,29].

This study aimed to test the relationship between intestinal permeability assessed with a well-established sugar absorption test and zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 concentrations in patients before and during the post-transplant period. We also attempted to correlate the zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 levels and intestinal permeability with a set of patients and transplant characteristics and transplantation complications.

## 2. Results

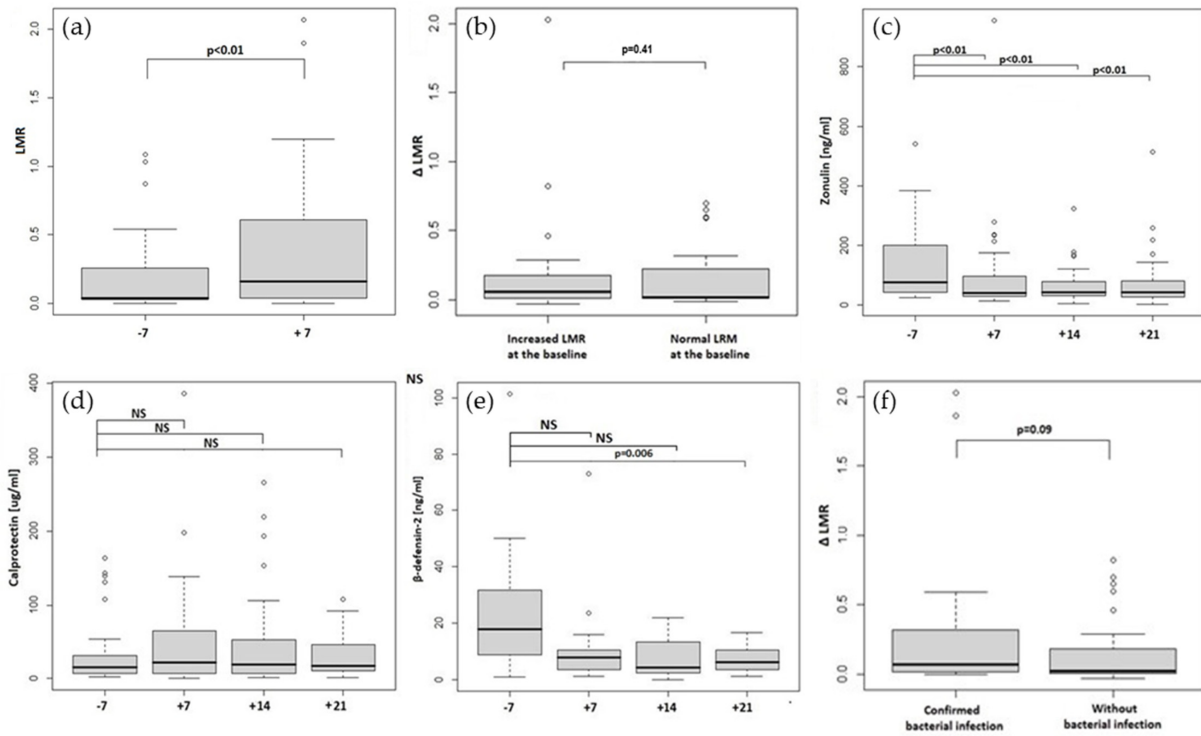
### 2.1. Increased Intestinal Permeability in Allo-HCT Recipients

The median lactulose to mannitol ratio in the urine (LMR) before the conditioning was 0.04 (0.002–1.084), which is above the reference range for the whole group of 45 patients that underwent a sugar absorption test (SAT).

Twenty four patients (53%) already had elevated LMR at the baseline before conditioning regimen initiation with a median value of 0.190 (0.039–1.084), while in the remaining 21 (47%) it was within the normal range, with a median equal to 0.028 (0.002–0.034). There was a significant correlation between LMR at  $-7$  and HCT CI score (lower LMR in the group with HCT CI of 0–2 and higher for the group with HCT-CI  $> 2$  on day  $-7$  (median 0.041; 0.002–1.084 vs. 0.43; 0.03–1.03,  $p = 0.035$ ).

Thirty four out of 45 patients (76%) had intestinal permeability increased on day  $+7$  (median 0.242; 0.03–2.068) and median LMR for the whole group on day  $+7$  was 0.16; 0.002–2.068,  $p < 0.05$ , as shown in Figure 2a. Interestingly, there was a remarkable, but not statistical difference in day  $+7$  (but not day  $-7$ ) LMR between patients  $<$  and  $>65$  yo (median 0.108; 0.02–2.068 vs. median 0.7 (0.03–1.1), as shown in Table 1. Interestingly, in the group with a worse transplant risk (HCT CI  $> 2$ ), the  $\Delta$ LMR was higher (0.09;  $-0.014$ –0.290) than in patients in the better risk group (HCT CI  $\leq 2$ ; 0.036;  $-0.03$ –2.027)  $p = 0.903$ , and a similar correlation was no longer observed in the age groups (Table 1). We did not observe significant correlations between median LMR on day  $-7$  or day  $+7$  and other patient or transplantation characteristics (Table 1).

Patients with increased permeability before transplantation seemed to experience a more considerable rise in LMR expressed as  $\Delta$ LMR (median  $\Delta$ LMR 0.060;  $-0.030$ –2.027) compared to patients with a normal ratio before transplantation (median  $\Delta$ LMR 0.016;  $-0.014$ –0.696;  $p > 0.05$ , as shown in Figure 2b).



**Figure 2.** (a) increased intestinal permeability before and after the allo-HCT expressed as lactulose to mannitol ratio in the urine after the SAT test for the whole group; (b) change in intestinal permeability ( $\Delta$ LMR) in patients with already increased LMR at the baseline and patients with LMR at the baseline within the reference limit; (c) zonulin stool concentrations before the conditioning and in the post-transplant period; (d) calprotectin stool concentrations before the conditioning and in the post-transplant period; (e) beta-defensin-2 stool concentrations before the conditioning and in the post-transplant period; (f) change in intestinal permeability ( $\Delta$ LMR) in patients with confirmed bacterial infection compared to those without this complication. A *p*-value less than 0.05 is considered to be statistically significant.

**Table 1.** Associations between median intestinal permeability (LMR) on day  $-7$  before transplantation, day  $+7$  after transplantations, and median difference between these values ( $\Delta$ LMR) and characteristics of patients and transplantation. A *p*-value less than 0.05 is considered to be statistically significant.

| Patient or Transplant Characteristic | N  | LMR Day $-7$ , Median (IQR) | <i>p</i> | LMR Day $+7$ Median (IQR) | <i>p</i> | $\Delta$ LMR Median (IQR) | <i>p</i> |
|--------------------------------------|----|-----------------------------|----------|---------------------------|----------|---------------------------|----------|
| All                                  | 45 | 0.04 (0.23)                 |          | 0.16 (0.57)               |          | 0.02 (0.18)               | x        |
| Increased LMR on day $-7$            | 24 | 0.19                        | <0.001   | 0.31                      | <0.001   | 0.06                      | 0.41     |
| Normal LMR on day $-7$               | 21 | 0.028                       |          | 0.038                     |          | 0.016                     |          |
| Sex                                  |    |                             |          |                           |          |                           |          |
| woman                                | 22 | 0.040 (0.041)               | 0.955    | 0.136 (0.588)             | 0.865    | 0.025 (0.152)             | 0.665    |
| men                                  | 23 | 0.043 (0.302)               |          | 0.271 (0.574)             |          | 0.020 (0.196)             |          |
| type of conditioning                 |    |                             |          |                           |          |                           |          |
| RIC                                  | 13 | 0.040 (0.038)               | 0.853    | 0.161 (0.628)             | 0.528    | 0.036 (0.280)             | 0.665    |
| myeloablative                        | 32 | 0.040 (0.243)               |          | 0.155 (0.527)             |          | 0.020 (0.139)             |          |

Table 1. Cont.

| Patient or Transplant Characteristic | N  | LMR Day -7, Median (IQR) | <i>p</i> | LMR Day +7 Median (IQR) | <i>p</i> | ΔLMR Median (IQR) | <i>p</i> |
|--------------------------------------|----|--------------------------|----------|-------------------------|----------|-------------------|----------|
| age                                  |    |                          |          |                         |          |                   |          |
| <65 years old                        | 40 | 0.040 (0.067)            | 0.367    | 0.108 (0.525)           | 0.164    | 0.025 (0.185)     | 0.639    |
| ≥65 years old                        | 5  | 0.026 (0.999)            |          | 0.700 (0.783)           |          | 0.020 (0.071)     |          |
| HCT-CI                               |    |                          |          |                         |          |                   |          |
| ≤2                                   | 25 | 0.041 (0.041)            | 0.035    | 0.161 (0.301)           | 0.364    | 0.036 (0.190)     | 0.903    |
| >2                                   | 6  | 0.430 (0.821)            |          | 0.670 (0.926)           |          | 0.090 (0.185)     |          |
| WHO                                  |    |                          |          |                         |          |                   |          |
| 0                                    | 28 | 0.037 (0.071)            | 0.423    | 0.181 (0.583)           | 0.737    | 0.028 (0.235)     | 0.423    |
| >0                                   | 17 | 0.044 (0.350)            |          | 0.110 (0.551)           |          | 0.018 (0.065)     |          |

### 2.2. Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Stool Concentrations

Zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 stool concentrations were assessed on day -7, +7, +14 and +21 after transplantation. Zonulin levels were significantly increased before the conditioning regimen initiation (76.45 ng/mL; 23.45–2040.35) and at the following time points compared to laboratory normal values < 30 ng/mL. In addition, we observed a significant decrease in the median zonulin level on day +7 after the conditioning (median 39.95 ng/mL; range;12.75–955.60 with  $p = 0.001$ ), which remained significantly decreased until day +21 (Table 2 and Figure 2c).

**Table 2.** Intestinal permeability expressed as LMR and stool biomarkers concentrations before the conditioning and in the post-transplant period. Normal value for LMR is <0.035, for zonulin it is <30 ng/mL, for calprotectin it is <50 µg/mL, and for beta-defensin-2 it is 8–60 ng/mL. A  $p$ -value less than 0.05 is considered to be statistically significant.

| Parameter               | -7            | +7           | +14           | +21          | <i>p</i> (-7 vs. +7) | <i>p</i> (-7:+21) |
|-------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|----------------------|-------------------|
|                         | Median (IQR)  | Median (IQR) | Median (IQR)  | Median (IQR) |                      |                   |
| LMR                     | 0.04 (0.23)   | 0.16 (0.57)  |               |              | <0.001               | -                 |
| Zonulin [ng/mL]         | 76.45 (157.2) | 39.95 (75.1) | 43.00 (47.75) | 41.45 (54.4) | <0.001               | <0.001            |
| Calprotectin [µg/mL]    | 15.50 (25.2)  | 21.50 (57.9) | 19.30 (44.9)  | 16.90 (35.5) | 0.374                | 0.451             |
| Beta-defensin-2 [ng/mL] | 17.90 (22.8)  | 7.80 (6.8)   | 4.31 (11.0)   | 6.20 (6.8)   | 0.101                | 0.006             |

Median calprotectin levels were within the normal range at the baseline and during the post-transplantation period, not significantly rising after the conditioning, as shown in Table 2 and Figure 2d.

Beta-defensin-2 median levels were also within the normal range during the transplantation period. However, we have seen a significant drop in beta-defensin-2 concentrations on day +21, as shown in Table 2 and Figure 2e.

### 2.3. Intestinal Permeability and Stool Biomarker Associations

There were no significant relationships between intestinal permeability expressed with LMR or ΔLMR and stool concentrations of zonulin, calprotectin or beta-defensin-2 as assessed with a Spearman's rank correlation test.

## 2.4. Correlations between the Transplantation Complications, Intestinal Permeability and Stool Biomarkers

### 2.4.1. Infectious Complications

Among all patients that underwent SAT, 14 had bacterial infection with positive culture within 30 days post-allo-HCT (confirmed bacterial infection). These patients had a higher, but not significantly median  $\Delta$ LMR of 0.069 (−0.001–2.027) compared with a median  $\Delta$ LMR of 0.020 (−0.030–0.820) in those who did not experience proven infection (Figure 2f). Furthermore, we did not see any relationship between stool biomarker levels and the incidence of a bacterial infection within 30 days after allo-HCT (as shown in Supplemental Table S1).

### 2.4.2. aGVHD

Among all patients, 16 developed aGVHD of any grade within 30 days of the transplantation (cutaneous in 11, hepatic in two, intestinal in three). We obtained the sample for calprotectin evaluation in 6 of the patients (5 with skin aGVHD and 1 with intestinal aGVHD). This group had higher calprotectin levels assessed on day 7 after the conditioning regimen compared to the group of patients without aGVHD (64.8 ng/mL vs. 14.1 ng/mL,  $p = 0.044$ ) as shown in Table 3. Surprisingly, patients who developed aGVHD had a lower concentrations of zonulin in the stool samples before the conditioning and across the whole transplantation period time-points comparing to patients without aGVHD (however the difference was not significant). There were no other significant differences in intestinal permeability or biomarkers between groups with and without aGVHD (as shown in Supplemental Table S2).

**Table 3.** Calprotectin and zonulin stool concentrations before the conditioning and in the post-transplant period in patients with and without aGVHD, \*  $p < 0.05$  between −7 and +7. Normal values for zonulin is <30 ng/mL and for calprotectin it is <50  $\mu$ g/mL. A  $p$ -value less than 0.05 is considered to be statistically significant.

| Parameter                  | −7           | 7            | 14           | 21           | $p$          |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                            | Median (IQR) | Median (IQR) | Median (IQR) | Median (IQR) |              |
| aGVHD                      |              |              |              |              |              |
| Calprotectin [ $\mu$ g/mL] | 10.3 (24.2)  | 64.8 (167.4) | 22.1 (26.0)  | 29.7 (40.3)  | $p > 0.05$ * |
| Zonulin [ng/mL]            | 51.4 (31.9)  | 42.8 (104.7) | 35.5 (21.0)  | 30.6 (116.4) | $p > 0.05$   |
| without aGVHD              |              |              |              |              |              |
| Calprotectin [ $\mu$ g/mL] | 15.6 (22.6)  | 14.1 (39.8)  | 17.7 (45.9)  | 14.9 (35.0)  | $p > 0.05$   |
| Zonulin [ng/mL]            | 86.7 (158.4) | 40 (63.1)    | 45.2 (52.8)  | 47.5 (51.4)  | $p > 0.05$   |

### 2.4.3. Mucositis

We have not observed a correlation between the risk of developing mucositis of any grade or of grade III and IV in patients with increased intestinal permeability expressed as LMR or stool biomarkers correlation as shown in Supplemental Table S3. In our study, mucositis development was only associated with myeloablative conditioning ( $p = 0.031$ ).

## 3. Discussion

In this study we wanted to assess the potential relationship between intestinal permeability assessed with a well-established sugar absorption test and certain markers of intestinal barrier damage i.e., zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 concentrations in patients before and during the post-transplant period. We also decided to investigate the correlation between zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 levels and intestinal perme-

ability with patients and transplant characteristics and transplantation complications. The main limitations of this study were the small number of patients that agreed to participate and problems with compliance regarding the stool collection. This issue led to the further decrease in the number of samples needed for biomarkers analysis.

Most patients undergoing allo-HCT had disrupted intestinal barriers and increased intestinal permeability measured as LMR after SAT before the start of the conditioning therapy. This was probably due to antibiotics use, damage to the gut by the cytotoxic chemotherapy, or leukemic infiltrations [30]. These findings are in line with previously published work. In the study by Sundström et al., intestinal permeability measured with SAT was significantly increased in 16 adult patients with de novo AML in comparison with healthy controls before, during and after induction chemotherapy [31]. Similar results were obtained by Blijlevens et al. when SAT was performed in a group of 18 patients undergoing cytotoxic chemotherapy for newly diagnosed AML or MDS [13]. Another small study on 20 leukemic patients has shown a trend toward increased intestinal permeability before the chemotherapy compared to healthy volunteers [32]. SAT is the reference test to assess intestinal permeability but has its limitations, i.e., it cannot distinguish between increased tight junction permeability and epithelial cell damage. Other disadvantages are the troublesome need for 6 h urine collection and the risk of diarrhea induction. Because of this, SAT did not become useful in clinical practice. In our research, we wanted to explore other potential intestinal permeability biomarkers for allo-HCT recipients. In recent years, zonulin has become one of the most popular tests for assessing leaky gut in many conditions [25–27]. However, it seems that zonulin release is not always the major mechanism responsible for the increase in intestinal permeability. To the best of our knowledge this was the first attempt to evaluate zonulin concentrations in the allo-HCT setting; however, our findings did not show any association between the permeability assay and zonulin concentrations. Surprisingly, zonulin concentration was elevated before the start of the conditioning in a majority of the patients (88%) and dropped significantly on day +7 after the HCT. In the subgroup of the patients who developed aGVHD, zonulin concentrations were lower than those without aGVHD, although this was not statistically significant. So far, these results are difficult to interpret. One possible explanation is that intensive conditioning before allo-HCT leads to the destruction of enterocytes and therefore impedes zonulin release. Zonulin's role in the development of intestinal barrier disruption and aGVHD in the allo-HCT setting needs more evaluation, possibly by evaluating and comparing serum and faecal zonulin concentrations before and after the conditioning.

Faecal beta-defensin-2 is an established intestinal inflammation marker that was used in several clinical trials mainly in the pediatric population to assess the effect of dietary interventions on infant colic [33], intestinal barrier permeability [34], and the occurrence of atopy [35] and infectious diseases [36]. To the best of our knowledge, beta-defensin-2 was not previously assessed in the allo-HCT patients. In our study, beta-defensin-2 levels decreased in the post-transplant period, although it was not statistically significant (probably due to the very small sample size for this evaluation). Data from *in vitro* and animal model studies [27,28] shows a beta-defensin-2 protective function during intestinal barrier damage, so it might be assumed that the lack of beta-defensin-2, possibly due to the damage of the intestinal epithelium, adds to the further gut barrier disruption in our patients. However, this assumption needs further evaluation.

A total of 58% of our patients experienced infectious complications within the first 30 days after allo-HCT, and 29% had a bacterial infection confirmed by a positive blood or urine culture. In addition, we had seen a trend showing that the risk of bacterial complications was augmented when patients had a higher increase in intestinal permeability (as  $\Delta$ LMR) which would confirm the results from previous studies on intestinal barrier integrity after allo-HCT, showing that decreased microbiota diversity in the peritransplant period increased the risk of bacteremia [2], pulmonary infiltration [7], and transplant related mortality after allo-HCT (mainly aGVHD and infections) [8].

An aGVHD diagnosis is based on clinical symptoms confirmed by histopathological evaluation. However, the diagnosis could be problematic because GVHD symptoms are similar to other common transplantation complications such as infections or drug toxicity. Therefore, in recent years, there has been a tremendous interest in searching for GVHD biomarkers that could facilitate the diagnosis. One of the potential markers is faecal calprotectin. In our study, 16 patients were diagnosed with aGVHD (cutaneous in 11, hepatic in two, and intestinal in three). Calprotectin concentrations for the whole group of patients after allo-HCT were within the normal range along the transplantation period, but the aGVHD subgroup of patients in which calprotectin was evaluated ( $n = 6$ ) had significantly higher median calprotectin concentrations at day +7 compared with the patients without this complication. This is in accordance with the latest meta-analysis of 10 studies involving 494 patients, which showed an increase in the median calprotectin level in patients with GI-GVHD compared to non-GI-GVHD patients [37].

In our study, 71% of patients developed mucositis, with 43% of grades III and IV. Mucositis was associated with myeloablative conditioning, a recognized risk factor for mucositis development [38,39] but not with intestinal permeability expressed as LMR and stool biomarkers.

Most of our patients had a disrupted intestinal barrier before the conditioning, which was associated with older age and higher HCT-CI. Increased intestinal barrier permeability assessed as LMR on day  $-7$  preceded further gut barrier disruption expressed as  $\Delta$ LMR and on subsequent days occurrence of bacterial infections. In our study, zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 concentrations did not correlate with intestinal permeability expressed as LMR. This data is mostly preliminary and the role of faecal markers in the assessment of intestinal barrier permeability needs further investigation.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Patients

Fifty-one patients undergoing allo-HCT at the Department of Hematology, Transplantation and Internal Medicine, University Clinical Center, Medical University of Warsaw, Poland, who consented to participate in the study and sample collection was feasible were enrolled in the study between September 2017 and December 2021. Thirty-seven underwent myeloablative conditioning, and 14 underwent reduced intensity conditioning (RIC). Prophylaxis against GVHD among myeloablatively conditioned patients consisted of cyclosporine A (CsA) and four doses of methotrexate (MTX) ( $n = 28$ ), CsA switched to tacrolimus (TAC) ( $n = 2$ ), TAC, mycophenolate mofetil (MMF) and cyclophosphamide ( $n = 2$ ). Anti-thymocyte globulin (ATG; 5 mg/kg/day for 2 consecutive days) was given when stem cells from an unrelated donor were used, together with CsA, MTX followed by TAC ( $n = 2$ ), CsA and MMF ( $n = 1$ ), TAC and MTX ( $n = 1$ ) and TAC with MMF in one patient.

In RIC patients, CsA with a course of MTX ( $n = 11$ ) or CsA together with MMF ( $n = 2$ ) and TAC with MMF ( $n = 1$ ) were used.

Further details regarding patient characteristics and the allo-HCT procedure are given in Table 4.

**Table 4.** Patients characteristics ( $n = 51$ ).

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| Age in years, median (range)  | 54.0 (19–67) |
| Male sex, n (%)               | 23 (45)      |
| Performance Status, n (%)     |              |
| 0                             | 30 (59)      |
| 1                             | 21 (41)      |
| Conditioning treatment, n (%) |              |
| myeloablative                 | 37 (73)      |
| RIC                           | 14 (27)      |

**Table 4.** *Cont.*

|  |              |
|--|--------------|
| Age in years, median (range)                 | 54.0 (19–67) |
| GVHD prophylaxis regimen, n (%)              |              |
| CSA/MTX                                      | 39 (76)      |
| other  | 12 (24)      |
| Disease, n (%)                               |              |
| Acute leukemia                               | 32 (63)      |
| Aplastic anemia                              | 3 (6)        |
| Myelodysplastic syndrome                     | 6 (12)       |
| Chronic myeloid leukemia                     | 3 (6)        |
| Others *                                     | 7 (13)       |
| Disease status before transplantation, n (%) |              |
| CR   | 28 (54)      |
| CR, MRD(+)                                   | 9 (18)       |
| PR   | 5 (10)       |
| PD   | 2 (4)        |
| Chronic phase                                | 2 (4)        |
| Transplantation upfront                      | 5 (10)       |
| Complications, n (%):                        |              |
| infections within 30 days (included FN):     | 30 (58)      |
| confirmed bacterial infection                | 15 (29)      |
| aGvHD  | 16 (31)      |
| aGvHD grade III and IV                       | 6 (12)       |
| mucositis                                    | 36 (71)      |
| mucositis grade III and IV                   | 22 (43)      |

Note. Data are median or number of patients. \* myelofibrosis (n = 2), MonoMac Syndrome n = 1, Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm n = 1, Chronic Lymphocytic leukemia n = 1, Chronic myelomonocytic leukemia n = 2. Abbreviations: FN (febrile neutropenia), CsA (cyclosporine A), MTX (methotrexate), RIC (reduced intensity conditioning), aGvHD (acute graft versus host disease), CR (complete remission), MRD + (molecular residual disease), PR (partial remission), PD (progressive disease).

#### 4.2. Methods

Before starting the conditioning regimen (day –7), a differential sugar absorption test (SAT) with mannitol and lactulose was performed, and a urine sample was taken to determine the lactulose to mannitol ratio. SAT and urine collection were repeated on day +7. Stool samples were taken for the zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 level determination on days –7, +7, +14 and +21 after allo-HCT. Faecal and urine samples were stored until the analysis at –80 °C. The material was transported under suitable conditions to the analysis site at the Department of Biochemistry and Human Nutrition of Pomeranian Medical University in Szczecin.

##### 4.2.1. Sugar Absorption Test

Forty five patients participated in the SAT part of the study, while six patients did not agree to participate or met exclusion criteria for SAT. The test depends on the difference in pathways of gut absorption for lactulose and mannitol [40]. If intercellular tight junctions are damaged or relaxed, urinary excretion of lactulose, which is absorbed primarily through a paracellular pathway, increases relative to mannitol, which is transcellularly absorbed. Therefore, the differential sugar absorption test can be regarded as a direct marker of intestinal permeability. The test began in the morning and was preceded by an 8 h fast. First, each participant was asked to empty their bladder and subsequently drink 500 mL of a water solution containing 7.5 g lactulose and 2 g mannitol. For the next 6 h, participants were allowed to eat, except for specified foods (milk and dairy products, simple sugars, high doses of vitamin C and mannitol), and were asked to collect all urine passed into one container. Finally, 400- $\mu$ L aliquots of urine from the collection container were assayed. These 400- $\mu$ L urine aliquots were mixed with 40  $\mu$ L of an internal standard (myo-inositol, 20 mg/mL) and evaporated to dryness by lyophilization. Next, 200  $\mu$ L of anhydrous pyridine in hydroxylamine (25 mg/mL) was added, mixed, and heated to 70 °C for one

hour. The sample was then centrifuged at  $800 \times g$  for 5 min, and 200  $\mu\text{L}$  of supernatant was collected. Next, sugars were silylated with 100  $\mu\text{L}$  of N-trimethylsilylimidazole for 30 min at  $70^\circ\text{C}$  and assayed by gas chromatography. Gas chromatography was performed with an Agilent Technologies 7890A GC System and capillary column (15 m  $\times$  0.530 mm, 1.50  $\mu\text{m}$ ; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Chromatographic conditions included an initial temperature of  $220^\circ\text{C}$  for 5 min, increased at a rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  for 2 min,  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  for 4 min, and  $3.5^\circ\text{C}/\text{min}$  for 4 min to a final temperature of  $274^\circ\text{C}$ , which was maintained for 7 min. The total time was approximately 22 min, and hydrogen was the carrier gas. Lactulose, mannitol, and myo-inositol were identified by comparing their retention times with those of commercially available standards.

#### 4.2.2. Stool Concentrations of Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Assays

The concentration of zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 in stool were determined with a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) following the manufacturer's protocol. Assay plate wells from the kits were coated with polyclonal antibodies; zonulin in the stool samples was conjugated to a biotinylated zonulin tracer and then immobilized on the plate. Calprotectin and beta-defensin-2 in the stool samples were conjugated to a peroxidase labelled conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) was used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution was added to terminate the reaction. The absorbance was measured by a photometer at 450 nm. A dose-response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration was generated using the values obtained from the standard [41–43]. Due to the lack of compliance in stool collection, zonulin concentration was evaluated in 32 patients, calprotectin in 31 patients, and beta-defensin-2 in 14 patients.

#### 4.2.3. Reference Limits

We have established internal upper reference limits of the lactulose to mannitol ratio (LMR) as  $<0.035$ , referring to previous studies and the group experience [40,44]. Calprotectin levels in stool  $<50 \mu\text{g}/\text{mL}$  were regarded as normal,  $50\text{--}100 \mu\text{g}/\text{mL}$  as borderline positive and  $>100 \mu\text{g}/\text{mL}$  as positive [45]. For zonulin stool concentrations, the normal range is  $<30 \text{ ng}/\text{mL}$ , referring to previous studies and our own experience [44]. For beta-defensin-2, the normal range is considered to be  $8\text{--}60 \text{ ng}/\text{mL}$  [42].

#### 4.2.4. Statistical Analysis

Results were presented as mean with standard deviation or as median with interquartile range (IQR) or extreme values regarding fulfillment criteria of normal distribution. Categorical variables were presented as numbers or numbers with the occurrence. The normality of investigated variables was checked with the Shapiro-Wilk test. For correlation assessment, the Spearman test or point-biserial correlation was performed. Differences between variables were analyzed with a T-test for parametric data, otherwise with a U-Mann-Whitney or Wilcoxon test in view of the dependency of variables. Differences in categorical data were analyzed with Chi2 or Fisher's exact test if the number of observations was low. To compare more than two nonparametric dependent variables, a Friedman's ANOVA test was used. Missing data were not substituted, but data available for each analysis were used. Two-tailed  $p < 0.05$  was considered significant. For statistical analysis, Statistica 12 software (StatSoft Polska, Cracow, Poland) was used.

## 5. Conclusions

Most patients undergoing allo-HCT had a disrupted intestinal barrier and increased intestinal permeability measured as LMR after SAT before the start of the conditioning therapy. HCT conditioning caused further damage to the gut epithelium and led to the increase in intestinal permeability measured as  $\Delta\text{LMR}$ . We did not find any association between permeability assay and zonulin, calprotectin or beta-defensin-2 concentrations. We confirmed the role of faecal calprotectin as a marker for aGVHD development. The role



of zonulin and beta-defensin-2 in increased intestinal permeability after allo-HCT requires further research.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232415962/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.T., G.W.B. and E.S.; methodology, D.M.-M.; software, A.L. and D.M.-M.; validation, M.T., D.M.-M. and A.L.; formal analysis, M.T., D.M.-M. and A.L.; investigation, M.T.; data curation, D.M.-M. and M.T.; writing—original draft preparation, M.T.; writing—review and editing, J.B., A.L. and G.W.B.; visualization, D.M.-M. and M.T.; supervision, J.B., G.W.B. and E.S.; project administration, M.T.; funding acquisition, M.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Polish National Science Centre, grant number 2018/29/N/NZ5/01779, competition PRELUDIUM 15. The APC was funded by grant number 2018/29/N/NZ5/01779.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Medical University of Warsaw (protocol code KB/166/2017 from 5/09/2017).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We want to thank Ewa Wąsiewicz for a technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

- Jenq, R.R.; Ubeda, C.; Taur, Y.; Menezes, C.C.; Khanin, R.; Dudakov, J.; Liu, C.; West, M.L.; Singer, N.V.; Equinda, M.J.; et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 903–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Taur, Y.; Xavier, J.; Lipuma, L.; Ubeda, C.; Goldberg, J.; Gobourne, A.; Lee, Y.J.; Dubin, K.A.; Socci, N.D.; Viale, A.; et al. Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 905–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jenq, R.R.; Taur, Y.; Devlin, S.M.; Ponce, D.M.; Goldberg, J.D.; Ahr, K.F.; Littmann, E.R.; Ling, L.; Gobourne, A.C.; Miller, L.C.; et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2015**, *21*, 1373–1383. [[CrossRef](#)]
- Holler, E.; Butzhammer, P.; Schmid, K.; Hundsrucker, C.; Koestler, J.; Peter, K.; Zhu, W.; Sporrer, D.; Hehlhans, T.; Kreutz, M.; et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2014**, *20*, 640–645. [[CrossRef](#)]
- Shono, Y.; Docampo, M.D.; Peled, J.U.; Perobelli, S.M.; Velardi, E.; Tsai, J.J.; Slingerland, A.E.; Smith, O.M.; Young, L.F.; Gupta, J.; et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 339ra71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mathewson, N.D.; Jenq, R.; Mathew, A.V.; Koenigsnecht, M.; Hanash, A.; Toubai, T.; Oravecz-Wilson, K.; Wu, S.-R.; Sun, Y.; Rossi, C.; et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 505–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harris, B.; Morjaria, S.M.; Littmann, E.R.; Geyer, A.I.; Stover, D.E.; Barker, J.N.; Giralt, S.A.; Taur, Y.; Pamer, E.G. Gut Microbiota Predict Pulmonary Infiltrates after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *194*, 450–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Taur, Y.; Jenq, R.; Perales, M.-A.; Littmann, E.R.; Morjaria, S.; Ling, L.; No, D.; Gobourne, A.; Viale, A.; Dahi, P.; et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2014**, *124*, 1174–1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Menard, S.; Cerf-Bensussan, N.; Heyman, M.B. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* **2010**, *3*, 247–259. [[CrossRef](#)]
- Lalla, R.V.; Sonis, S.T.; Peterson, D.E. Management of Oral Mucositis in Patients Who Have Cancer. *Dent. Clin. N. Am.* **2008**, *52*, 61–77. [[CrossRef](#)]
- Johansson, J.-E.; Ekman, T. Gastro-intestinal toxicity related to bone marrow transplantation: Disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. *Bone Marrow Transplant.* **1997**, *19*, 921–925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Johansson, J.E.; Brune, M.; Ekman, T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* **2001**, *28*, 737–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Blijlevens, N.M.A.; Donnelly, J.P.; M'Rabet, L.; De Pauw, B.E.; Land, B.V. Measuring mucosal damage induced by cytotoxic therapy. *Support. Care Cancer* **2004**, *12*, 227–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Johansson, J.-E.; Ekman, T. Gut Toxicity During Hemopoietic Stem Cell Transplantation May Predict Acute Graft-Versus-Host Disease Severity in Patients. *Am. J. Dig. Dis.* **2007**, *52*, 2340–2345. [[CrossRef](#)]
15. Cooke, K.R.; Gerbitz, A.; Crawford, J.M.; Teshima, T.; Hill, G.R.; Tesolin, A.; Rossignol, D.P.; Ferrara, J.L. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107*, 1581–1589. [[CrossRef](#)]
16. Peled, J.U.; Gomes, A.L.; Devlin, S.M.; Littmann, E.R.; Taur, Y.; Sung, A.D.; Weber, D.; Hashimoto, D.; Slingerland, A.E.; Slingerland, J.B.; et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 822–834. [[CrossRef](#)]
17. Bates, D.W.; Parsonnet, J.; Ketchum, P.A.; Miller, E.B.; Novitsky, T.J.; Sands, K.; Hibberd, P.L.; Graman, P.S.; Lanke, P.N.; Schwartz, J.S.; et al. Limulus Amebocyte Lysate Assay for Detection of Endotoxin in Patients with Sepsis Syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *27*, 582–591. [[CrossRef](#)]
18. Strutz, F.; Heller, G.; Krasemann, K.; Krone, B.; Müller, G.A. Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intensiv. Care Med.* **1999**, *25*, 435–444. [[CrossRef](#)]
19. Blijlevens, N.M.A.; Lutgens, L.C.H.W.; Schattenberg, A.V.M.B.; Donnelly, J.P. Citrulline: A potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant.* **2004**, *34*, 193–196. [[CrossRef](#)]
20. Crenn, P.; Coudray-Lucas, C.; Thuillier, F.; Cynober, L.; Messing, B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 1496–1505. [[CrossRef](#)]
21. Vreugdenhil, A.C.; Wolters, V.M.; Adriaanse, M.P.; Van den Neucker, A.M.; van Bijnen, A.A.; Houwen, R.; Buurman, W.A. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand. J. Gastroenterol.* **2011**, *46*, 1435–1441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Prasad, S.; Mingrino, R.; Kaukinen, K.; Hayes, K.L.; Powell, R.M.; Macdonald, T.T.; Collins, J. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Investig.* **2005**, *85*, 1139–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Silberer, H.; Küppers, B.; Mickisch, O.; Baniewicz, W.; Drescher, M.; Traber, L.; Kempf, A.; Schmidt-Gayk, H. Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin. Lab.* **2005**, *51*, 117–126. [[PubMed](#)]
24. Aasebo, A.T.; Gedde-Dahl, T.; Reims, H.M.; Baekkevold, E.S.; Jahnsen, F.L. Calprotectin Expressing Donor-Derived Macro-phages Increase in Acute Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease. *Transplant. Cell. Ther.* **2022**, *28*, 248–e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fasano, A. Physiological, Pathological, and Therapeutic Implications of Zonulin-Mediated Intestinal Barrier Modulation: Living Life on the Edge of the Wall. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 1243–1252. [[CrossRef](#)]
26. Wang, W.; Uzzau, S.; Goldblum, S.E.; Fasano, A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J. Cell. Sci.* **2000**, *113 Pt 24*, 4435–4440. [[CrossRef](#)]
27. Fasano, A. Intestinal Permeability and Its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *10*, 1096–1100. [[CrossRef](#)]
28. Fusco, A.; Savio, V.; Donniacuo, M.; Perfetto, B.; Donnarumma, G. Antimicrobial Peptides Human Beta-Defensin-2 and -3 Protect the Gut During *Candida albicans* Infections Enhancing the Intestinal Barrier Integrity: In Vitro Study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 486. [[CrossRef](#)]
29. Han, F.; Zhang, H.; Xia, X.; Xiong, H.; Song, D.; Zong, X.; Wang, Y. Porcine  $\beta$ -Defensin 2 Attenuates Inflammation and Mucosal Lesions in Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 1882–1893. [[CrossRef](#)]
30. Costa-Lima, C.; De Paula, E.V. 'Leaky gut' in hematological malignancies. *Rev. Bras. De Hematol. E Hemoter.* **2014**, *36*, 390–391. [[CrossRef](#)]
31. Sundström, G.M.; Wahlin, A.; Nordin-Andersson, I.; Suhr, O.B. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leu-kemia. *Eur. J. Haematol.* **1998**, *61*, 250–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Leite, J.B.; Vilela, E.G.; Torres, H.O.D.G.; Ferrari, M.D.L.D.A.; da Cunha, A.S. Intestinal permeability in leukemic patients prior to chemotherapy. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2014**, *36*, 409–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nocerino, R.; De Filippis, F.; Cecere, G.; Marino, A.; Micillo, M.; Di Scala, C.; de Caro, C.; Calignano, A.; Bruno, C.; Paparo, L.; et al. The therapeutic efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> in infant colic: A randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2020**, *51*, 110–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Siljander, H.; Jason, E.; Ruotula, T.; Selvenius, J.; Koivusaari, K.; Salonen, M.; Ahonen, S.; Honkanen, J.; Ilonen, J.; Vaarala, O.; et al. Effect of Early Feeding on Intestinal Permeability and Inflammation Markers in Infants with Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *J. Pediatr.* **2021**, *238*, 305–311.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Savilahti, E.M.; Kukkonen, A.K.; Tuure, T.; Kuitunen, M.; Haahtela, T. Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* **2011**, *42*, 405–411. [[CrossRef](#)]
36. Nocerino, R.; Paparo, L.; Terrin, G.; Pezzella, V.; Amoroso, A.; Cosenza, L.; Cecere, G.; De Marco, G.; Micillo, M.; Albano, F.; et al. Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* **2017**, *36*, 118–125. [[CrossRef](#)]
37. Malik, M.N.; Rafea, A.; Durer, C.; Durer, S.; Anwer, F. Fecal Calprotectin as a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Gastrointestinal Graft Versus Host Disease: A Systematic Review of Literature. *Cureus* **2019**, *11*, e4143.

38. Legert, K.G.; Remberger, M.; Ringdén, O.; Heimdahl, A.; Dahllöf, G. Reduced intensity conditioning and oral care measures prevent oral mucositis and reduces days of hospitalization in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Support. Care Cancer* **2014**, *22*, 2133–2140. [CrossRef]
39. Haverman, T.M.; Raber-Durlacher, J.E.; Rademacher, W.M.H.; Vokurka, S.; Epstein, J.B.; Huisman, C.; Hazenberg, M.; De Soet, J.J.; De Lange, J.; Rozema, F.R. Oral Complications in Hematopoietic Stem Cell Recipients: The Role of Inflammation. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 378281. [CrossRef]
40. Bjarnason, I.; Macpherson, A.; Hollander, D. Intestinal permeability: An overview. *Gastroenterology* **1995**, *108*, 1566–1581. [CrossRef]
41. Zonulin Elisa. Available online: [https://www.immundiagnostik.com/media/pages/testkits/k-5600/17c79275c91653271285/k5600\\_2022-02-16\\_idk-zonulin-elisa.pdf](https://www.immundiagnostik.com/media/pages/testkits/k-5600/17c79275c91653271285/k5600_2022-02-16_idk-zonulin-elisa.pdf) (accessed on 1 March 2022).
42.  $\beta$ -Defensin 2 ELISA. Available online: [https://www.immundiagnostik.com/media/pages/testkits/k-6500/facd9e2d16-1653271285/k6500\\_2022-02-24\\_beta-defensin.pdf](https://www.immundiagnostik.com/media/pages/testkits/k-6500/facd9e2d16-1653271285/k6500_2022-02-24_beta-defensin.pdf) (accessed on 1 March 2022).
43. Calprotectin Elisa. Available online: [https://www.idkna.com/docs/KR6927\\_2022-02-15\\_IDK\\_Calprotectin\\_Stuhl\\_1h.pdf](https://www.idkna.com/docs/KR6927_2022-02-15_IDK_Calprotectin_Stuhl_1h.pdf) (accessed on 1 March 2022).
44. Hałasa, M.; Maciejewska, D.; Rytarska, K.; Bańkiewicz-Hałasa, M.; Safranow, K.; Stachowska, E. Assessing the Association of Elevated Zonulin Concentration in Stool with Increased Intestinal Permeability in Active Professional Athletes. *Medicina* **2019**, *55*, 710. [CrossRef] [PubMed]
45. Bjarnason, I. The Use of Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *13*, 53–56.



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/leukres](http://www.elsevier.com/locate/leukres)

Research paper

## Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation

Martyna Tyszka<sup>a,\*</sup>, Dominika Maciejewska-Markiewicz<sup>b</sup>, Daniel Styburski<sup>c</sup>, Jarosław Biliński<sup>a</sup>, Agnieszka Tomaszewska<sup>a</sup>, Ewa Stachowska<sup>b</sup>, Grzegorz W. Basak<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Hematology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Department of Human Nutrition and Metabolomics, Pomeranian Medical University in Szczecin, 71-460 Szczecin, Poland

<sup>c</sup> Sanprobi Sp. z O. O. Sp. K., Kurza Stopka 5/C, 70-535 Szczecin, Poland



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Metabolomics  
Metabolic profiles  
Lipidomics  
Allo-HCT  
aGVHD

## ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) remains the sole curative option for many hematological malignancies and other diseases. Nevertheless, its application is limited due to the risk of life-threatening complications, mainly graft-versus-host disease (GVHD). Currently, in clinical practice, the risk of developing GVHD is estimated for every patient based on factors related to the donor and the host. In our prospective, observational study, we analyzed serum from 38 patients undergoing allo-HCT at our institution. We compared the metabolic profiles of patients who developed acute GVHD (aGVHD) with those without such complication by identification and comparison of metabolites masses on the XCMS platform. We observed that patients diagnosed with aGVHD had different metabolic profiles compared to the remaining patients and this alteration was noticeable already 7 days before the procedure. We identified dysregulated metabolites involved in bile acid transformation and cholesterol synthesis. Our study of the untargeted metabolome in allo-HCT recipients has revealed a potential link between lipid metabolism, specifically involving bile acid transformation and cholesterol synthesis, and the development of aGVHD. This finding might be an important indication for future research focused on understanding GVHD development, discovering prediction models, and investigating possible prophylactic interventions.

## 1. Introduction

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) remains the only curative option for many hematological malignancies and other diseases. Still, its application is limited due to the risk of life-threatening complications, mainly graft-versus-host disease (GVHD). So far, the risk of developing GVHD is estimated for every patient based on clinical factors e.g. HLA mismatch, gender disparity, older age of the donor and/or recipient, stem-cell source, alloimmunization of the donor and Cytomegalovirus and Epstein Barr virus seropositivity [1]. In the past few decades, proteomic studies revealed several plasma biomarkers of GVHD development [2–4] but the latest approach aimed at biomarkers discovery is non-targeted metabolomics. The metabolomic analysis evaluates global changes in amino acids, carbohydrates, lipids, nucleotides, and microbiome metabolism [5]. Two studies showed different

pre-transplant metabolic profiles in patients who eventually developed acute GVHD (aGVHD) [6,7]. Other studies showed that in the post-transplant period changes in stearic and palmitic acids metabolism [8], microbiota-derived metabolites [9], ornithine, arginine, and proline metabolism pathway [10] were associated with aGVHD development.

In our study, we evaluated the metabolic profiles during the peri-transplantation period, of 38 patients of which 15 developed aGVHD. We used untargeted metabolomics based on the identification and comparison of masses of the different metabolites on the XCMS platform. We observed that patients diagnosed with aGVHD had different metabolic profiles compared to the remaining patients and such change was visible already 7 days before the procedure. We identified dysregulated metabolites involved in bile acid transformation and cholesterol synthesis.

\* Corresponding author.

E-mail address: [martyna.tyszka@wum.edu.pl](mailto:martyna.tyszka@wum.edu.pl) (M. Tyszka).

<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2024.107435>

Received 13 October 2023; Received in revised form 25 December 2023; Accepted 3 January 2024

Available online 5 January 2024

0145-2126/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patient selection and sample collection

Thirty-eight patients undergoing allo-HCT at the Department of Hematology, Transplantation and Internal Medicine, University Clinical Center, Medical University of Warsaw, Poland, who consented to participate in the study and donated serum samples on days - 7, + 7, and + 21, to be frozen and stored, were enrolled between September 2017 and December 2021. Twenty-seven patients underwent myeloablative conditioning, and 11 underwent reduced-intensity conditioning (RIC). The procedure of gut decontamination was not practiced. Statins or fibrates were not prescribed to the patients even in the case of atherogenic dyslipidemia because of the risk of interactions with drugs used in the peri-transplantation period.

Prophylaxis against GVHD among myeloablatively conditioned patients consisted of cyclosporine A (CSA) and four doses of methotrexate (MTX) (n = 17), CSA switched to tacrolimus (TAC) (n = 1), TAC, mycophenolate mofetil (MMF) (n = 1), CSA, TAC, MTX, n = 3, CSA, TAC n = 1. Anti-thymocyte globulin (ATG; 5 mg/kg/day for 2 consecutive days) was given when stem cells from an unrelated donor were used, together with CSA, MTX followed by TAC (n = 2), TAC, and MTX (n = 2). In RIC patients, CSA with a course of MTX (n = 8) and TAC with MMF (n = 1), TAC with MTX (n = 1), and CSA with MMF (n = 1).

All patients remained on the hospital diet designed for allo-HCT recipients, which is without fresh fruits and vegetables and lactose-free. There was no obligation of overnight fasting. Serum samples were taken at days - 7, + 7, + 21 after allo-HCT, before the breakfast at 6:00–6:30 a.m. The samples were later stored at - 80 °C, and transported to the analysis site under suitable conditions. Fifteen patients developed aGVHD and 23 patients remained free from this complication and are described as a non-aGVHD group. Further details regarding patient characteristics with factors potentially influencing lipid metabolism as Body Mass Index (BMI) and past medical history (including the presence of diabetes, hypercholesterolemia, and hypertriglyceridemia) and details regarding the allo-HCT procedure are given in [Table 1](#).

### 2.2. Preparation of material for analysis

200 µl of serum was added to a mixture of 200 µl methanol with 200 µl acetonitrile. The sample was shaken at 2000 rpm at 4 °C for 30 min to dissolve the metabolites in the solution and precipitate the protein. In the next step, the samples were centrifuged for 4 min at a speed of 4000 rpm and a temperature of 4 °C. After the samples were centrifuged, the supernatant was transferred into the chromatography tubes through a 0.22 µm syringe filter. The prepared samples were analyzed on the same day by liquid chromatography-mass spectrometry. QC samples were prepared by mixing 10 test samples in equal proportions and prepared in the same way as the test samples.

### 2.3. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

The analysis was carried out on an ExionLC liquid chromatograph equipped with a binary pump, autosampler, and column thermostat coupled with a Triple TOF 6600 + mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA). The separation was carried out on a Phenomenex Luna® Omega 1.6 µm polar C18 150 × 2.1 mm column for 55 min in gradient separation. The mobile phases were: Phase A - Water with 10 mM ammonium acetate, Phase B - acetonitrile with 0.1% formic acid. The column injection was 2 µl and the column temperature was 25 °C. The phase flow was 0.2 ml/min. Spectral analysis was performed in positive ion mode with a capillary voltage of 5500 V and temperature 400 °C. The spectrometer collected spectral data in SWATH mode.

### 2.4. Analysis of the results

Untargeted metabolomics is based on the identification and comparison of masses on the XCMS platform. Data files obtained from the spectral analysis were uploaded to the XCMS platform, keeping the division into groups. In the next step, a new task was created in which the analyzed data groups were combined with a data analysis method compatible with the type of spectrometer and the separation method. XCMS is a database that analyzes raw mass spectrometry spectra and then identifies the compounds contained in them. In the next step, a statistical analysis of the identified compounds was performed based on the areas of the spectral peaks. Therefore, the obtained result contains only those metabolites that differ significantly between groups [11]. Basic parameters of the method: the level of  $p < 0.05$  was assumed as a significant difference and the p-value threshold for highly significant features was  $p < 0.01$ . The maximal tolerated  $m/z$  deviation was 6 ppm and the fold change threshold was 1.5.

## 3. Results

### 3.1. Changes in serum metabolites on days - 7, + 7, and + 21 after transplantation

In total; dysregulations of 418 metabolites on day - 7, 388 metabolites on day + 14, and 378 metabolites on day + 21 were observed as presented in [Fig. 1](#). The greatest metabolic dysregulations are observed in the serum of aGVHD group compared with the non-aGVHD group on day 7 before allo-HCT. This is evidenced by the largest number of dysregulated metabolites (418 features) and the largest vesicle diameters compared to the other graphs. Most of the features on the plots were downregulated compared to the non-aGVHD group. In addition, based on the chromatographic separation, most of the dysregulated metabolites are hydrophobic (late retention time).

### 3.2. Evaluation of serum metabolic profiles based on principal component analysis scores plots

Principal component analysis (PCA) scores plots represent different clusters of metabolites in patients with aGVHD and patients without this complication. In [Fig. 2a, b\) and c\)](#) there are visible clear groupings that indicate the presence of different metabolites between the non-aGVHD and aGVHD group (aGVHD group features are clustered below non-aGVHD features). Additional groupings in both aGVHD and non-aGVHD groups indicate that some differences might result from other confounding factors rather than solely aGVHD development.

### 3.3. Difference in metabolic profiles between aGVHD and non-aGVHD patients

[Table 2](#) shows identified metabolites that were significantly dysregulated in aGVHD patients compared with the non-aGVHD group. The identified pathways involve bile acid transformation and cholesterol biosynthesis. Data from day - 7 and + 7 show upregulation of (25R)-5β-cholestane-3α,7α,12α,26-tetraol and downregulation of glycocholate whereas on day 21 after allo-HCT we see additional dysregulation in metabolites of the cholesterol synthesis pathway.

## 4. Discussion

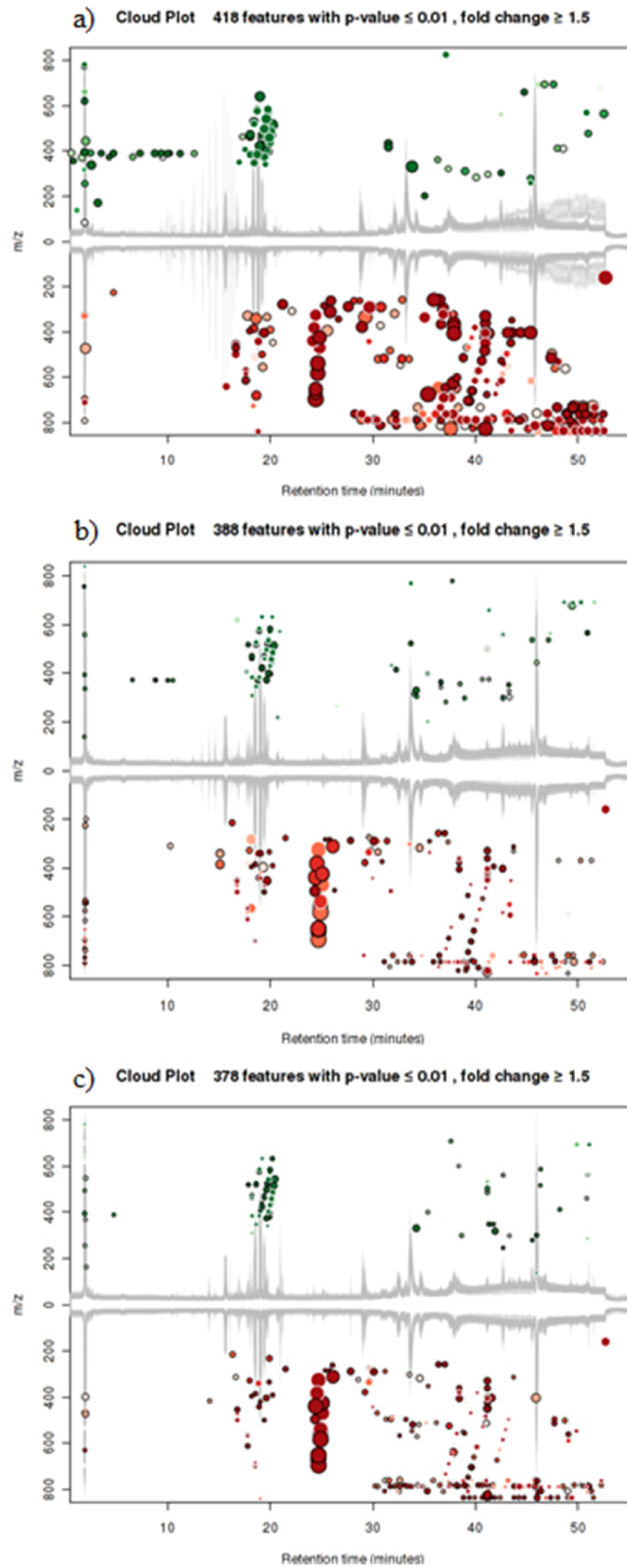
Metabolomics is gaining growing interest across diverse research areas, including pathophysiology, the analysis of biochemical pathways, and the search for novel biomarkers. Metabolomics protocols involve untargeted and targeted analysis. Liquid chromatography (LC)

**Table 1**  
Patients' characteristics (n = 38).

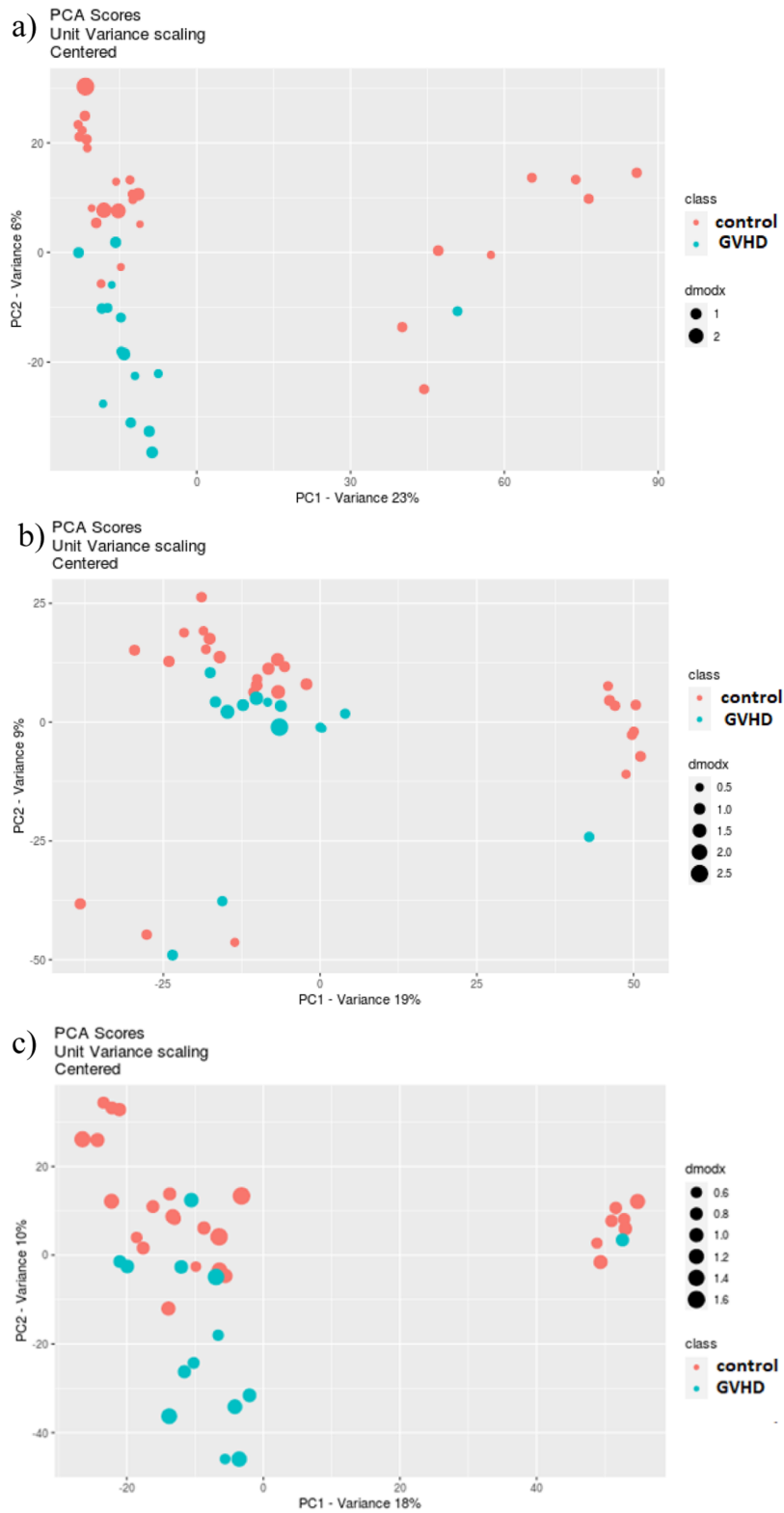
| Patient characteristic   | aGVHD<br>n = 15                      | non-aGVHD<br>n = 23 |
|--|--------------------------------------|---------------------|
| Sex  | n (%)                                |                     |
| woman  | 7 (47)                               | 11 (48)             |
| men  | 8 (53)                               | 12 (52)             |
| Age in years   | median (range)                       |                     |
|  | 52 (22-66)                           | 54 (21-66)          |
| Body Mass Index  | kg/m <sup>2</sup> , median (range)   |                     |
|  | 24,9 (20,2 - 38,5)                   | 24,1 (19,4 - 31,8)  |
| Past medical history   | n (%)                                |                     |
| Diabetes mellitus  | 3 ( 20)                              | 0 ( 0)              |
| Hypercholesterolemia   | 4 (27)                               | 6 (26)              |
| Hypertriglyceridemia   | 4 (27)                               | 4 (17)              |
| Type of conditioning   | n (%)                                |                     |
| RIC  | 4 (27)                               | 7 (30)              |
| myeloablative  | 11 (73)                              | 16 (70)             |
| Type of graft  | n (%)                                |                     |
| PBSC (fresh)   | 15 (100)                             | 18 (78)             |
| PBSC (frozen)  | 0 (0)                                | 2 (9)               |
| BM (fresh)   | 0 (0)                                | 3 (13)              |
| BM (frozen)  | 0 (0)                                | 0 (0)               |
| Amount of CD 34 + cells  | Median (range)                       |                     |
|  | x 10 <sup>6</sup> per kg             |                     |
| PBSC   | 7,15 (4,95 - 8,09)                   | 7,05 (4,14 - 8,42)  |
| BM   | x                                    | 1,02 (0,76 - 2,49)  |
| Performance status   | n (%)                                |                     |
| 0  | 5 (33)                               | 16 (70)             |
| 1  | 10 (67)                              | 7 (30)              |
| 2-3  | 0 (0)                                | 0 (0)               |
| HCT-CI   | n (%)                                |                     |
| ≤ 2  | 13 (87)                              | 19 (82)             |
| > 2  | 2 (13)                               | 4 (18)              |
| GVHD prophylaxis regimen   | n (%)                                |                     |
| CSA/MTX  | 11 (73)                              | 14 (61)             |
| TAC/MMF  | 0 (0)                                | 2 (9)               |
| ATG/CSA/MTX,   | 0 (0)                                | 2 (9)               |
| TAC/MTX  | 1 (7)                                | 2 (9)               |
| Cyclophosphamide/TAC/MMF   | 0 (0)                                | 1 (4)               |
| CSA/TAC/MTX  | 2 (13)                               | 1 (4)               |
| CSA/TAC  | 1 (7)                                | 0 (0)               |
| CSA/MMF  | 0 (0)                                | 1 (4)               |
| Disease, n (%)   |                                      |                     |
| Acute leukemia   | 10 (67)                              | 15 (65)             |
| Myelodysplastic syndrome   | 2 (13)                               | 1 (4)               |
| Aplastic anemia  | 0                                    | 2 (9)               |
| Others *   | 3 (20)                               | 5 (22)              |
| Disease status before transplantation, n (%)                                 |                                      |                     |
| CR   | 11 (73)                              | 11 (48)             |
| CR, MRD(+)   | 2 (13)                               | 6 (26)              |
| PR   | 2 (13)                               | 1 (4)               |
| PD   | 0                                    | 2 (8)               |
| Upfront  | 0                                    | 3 (13)              |
| Treatment outcome and complications  | n (%)                                |                     |
| Relapse Rate   | 3 (20)                               | 7 (30)              |
| Mortality within 100 days  | 3 (20)                               | 1 (4)               |
| Infection within 30 days   |                                      |                     |
| Microbiologically confirmed bloodstream infection                            | 6 (40)                               | 6 (26)              |
| Suspected infection treated with antibiotics (including febrile neutropenia) | 13 (87)                              | 13 (57)             |
| aGVHD  |                                      |                     |
| Onset  | Day after allo-HCT<br>median (range) | x                   |
|  | 34,5 (19 - 125)                      | x                   |
| Grade  | n (%)                                | x                   |
| I and II   | 9 (60)                               | x                   |
| III and IV   | 6 (40)                               | x                   |
| Site affected  | n (%)                                | x                   |
| Gut  | 3 (20)                               | x                   |
| Skin   | 11 (73)                              | x                   |
| Liver  | 1 (7)                                | x                   |

Note. Data are median or number of patients. \* myelofibrosis (n = 2), MonoMac syndrome n = 1, Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm n = 1, Chronic lymphocytic leukemia n = 1, Chronic myelomonocytic leukemia n = 2, Chronic myeloid leukemia n = 1.

Abbreviations: RIC (reduced intensity conditioning), PBSC (Peripheral blood stem cells), BM (bone marrow), HTC-CI (Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index), CSA (cyclosporine A), MTX (methotrexate), TAC (tacrolimus), MMF (Mycophenolate mofetil), ATG (Anti-thymocyte globulin), aGVHD (acute graft versus host disease), CR (complete remission), MRD + (molecular residual disease), PR (partial remission), PD (progressive disease).



**Fig. 1.** Cloud plot of changes in metabolic profiles of patients that developed aGVHD compared to non-aGVHD patients a) 7 days before the allo-HCT, b) on day + 7, and c) on day + 21. Green bubbles represent the up-regulated features whereas the red ones represent the down-regulated features compared to patients without aGVHD. Bubble diameter is proportional to fold change.



**Fig. 2.** Principal component analysis plot of different clusters of metabolites in aGVHD group and non-aGVHD group a) 7 days before the allo-HCT, b) on day + 7, and c) on day + 21. Bubble diameter is proportional to fold change. PC1 describes the most variation components, and PC2 describes the second most variation.



**Table 2**Serum metabolites differences of aGVHD group and non-GVHD group on days - 7, + 7, and + 21 after allo-HCT. \**m/z* = mass/charge.

| Metabolite  | Metabolites /Pathways involved          | Dysregulation | Fold Change | p        | <i>m/z</i> * |
|---|---|---------------|-------------|----------|--------------|
| <b>Day - 7</b>  |   |               |             |          |              |
| (25 R)- 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetraol | Bile acid biosynthesis, neutral pathway | UP            | 2.5         | 0.00004  | 459.347      |
| glycocholate  | Bile acid biosynthesis, neutral pathway | DOWN          | 5.5         | 0.0004   | 449.293      |
| <b>Day + 7</b>  |   |               |             |          |              |
| (25 R)- 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetraol | Bile acid biosynthesis, neutral pathway | UP            | 2.7         | 0.0001   | 459.347      |
| glycocholate  | Bile acid biosynthesis, neutral pathway | DOWN          | 4.5         | 0.0002   | 449.293      |
| <b>Day + 21</b>   |   |               |             |          |              |
| (25 R)- 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetraol | bile acid biosynthesis, neutral pathway | UP            | 3           | 0.000006 | 459.347      |
| glycocholate  | bile acid biosynthesis, neutral pathway | DOWN          | 4.8         | 0.0002   | 449.293      |
| 3-dehydro-4- methylzymosterol   | zymosterol biosynthesis                 | DOWN          | 1.4         | 0.002    | 419.330      |
| 5 $\alpha$ -cholesta-8,24-dien-3-onezymosterol                                | zymosterol biosynthesis                 | UP            | 1.6         | 0.002    | 405.3146     |

untargeted metabolomic, has high-throughput detection, which offers a comprehensive and in-depth insight of metabolome and is regarded as the basis for biomarker discovery [12].

In our preliminary study, we performed a non-targeted metabolome analysis of the serum of the patients who underwent allo-HCT, focusing especially on the patients who developed aGVHD. We observed that patients diagnosed with aGVHD have different metabolic profiles compared to the remaining patients and such change was visible already 7 days before the procedure. We also identified significant differences in lipid pathways metabolism involving the bile acid transformations and cholesterol synthesis. From the bile acid synthesis pathway, we observed two related dysregulated metabolites: 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetraol and glycocholic acid. 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetraol is one of the intermediates in the bile acid biosynthesis pathway. It is converted into 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrahydroxy-5- $\beta$ -cholestane via cholestanetetraol 26-dehydrogenase, one of the enzyme of cytochrome P450 [13]. Glycocholic acid is a secondary bile acid, a product of bacterial biotransformation of primary bile acids by *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, and *Clostridium* in the intestines [14]. Our study revealed that before and after allo-HCT, glycocholate was significantly down-regulated in aGVHD group compared with non-aGVHD patients. One of the possible explanations of such difference could be the disrupted microbial composition, that is, dysbiosis present in those patients. There is a lot of evidence on the strong effect of the intestinal microbiota and aGVHD development although this relationship is still not fully understood. Early animal and human studies have shown that germ-free conditions or gut decontamination can lead to a decrease in aGVHD incidence [15–17] but later studies would not confirm these results [18] and the practice of gut decontamination was abandoned in most of the centers. Recently, it was observed that increased bacterial diversity especially the abundance of anaerobic bacteria from the genus *Blautia* is associated with reduced GVHD-related mortality [19], and the loss of diversity is associated with transplant-related mortality such as infection and GVHD [20,21]. Secondary bile acids are essential for the modulation of the host immune functions [22–24] hence the loss of glycocholate in our patients could be a simple marker of decreased bacterial diversity on one hand and a risk factor for aGVHD development on the other, although this needs further confirmation as the microbial diversity was not evaluated in this study.

It is worth underlining that metabolic changes associated with aGVHD were observed already before the allo-HCT. In another study conducted at our center, evaluating the intestinal barrier in allo-HCT recipients we also found that most of our patients had a disrupted intestinal barrier measured with the sugar-absorption test already before the conditioning [25]. This suggests that observed changes after

allo-HCT in the intestinal barrier or metabolome may not be solely attributed to the transplantation itself, but rather result from complex treatments including antibiotics and steroids administered in the pre-transplant period. [26–28].

Glycocholic and its sodium anion glycocholate, are also involved in the emulsification and absorption of fats. Downregulation of glycocholate can be connected with improper fat metabolism [29]. Wu et al. revealed that patients with high stearic acid/palmitic acid ratios on day 7 after allo-HCT were less likely to develop GVHD than patients with low stearic/palmitic acid ratios [8]. Both stearic and palmitic acids, as saturated fatty acids, can increase the synthesis of intracellular cholesterol [30]. Our study revealed that cholesterol synthesis was dysregulated on day + 21 after the allo-HCT procedure. We observed downregulation of 3-dehydro-4-methylzymosterol and upregulation of 5 $\alpha$ -cholesta-8,24-dien-3-onezymosterol which are metabolites of the zymosterol (cholesterol intermediate) synthesis. Blaser et al. performed a retrospective analysis of 761 patients who underwent allo-HCT from 1998 to 2008 and survived more than 100 days. In the first 2 years, 73.4% of patients developed hypercholesterolemia [31]. Several other studies showed that the incidence of post-transplantation hyperlipidemia ranges from 11% to 58% [32] Hatfield et al. performed pretransplant systemic lipidomic profiles of 92 allo-HCT patients. 69 lipid metabolites differed significantly when compared to patients without acute GVHD. Fifty-seven of the 69 metabolites were mono-, di- and triacylglycerols, and the most significant metabolites were acylglycerols [33]. The mechanism of dyslipidemia development in the allo-HCT recipients is complex and the risk factors are age, proteinuria, obesity, primary genetic lipid disorders, increased alcohol intake, hypogonadism, and hypothyroidism [34]. However, the leading cause might be the immunosuppressive treatment after allo-HCT, i.e. use of CSA, tacrolimus, and especially systemic steroids that induce hyperglycemia and weight gain but also directly affect lipid metabolism pathways. In our study, 93% of the patients in the aGVHD group received CSA treatment, 4 of them received tacrolimus and 2 of them received high doses of methylprednisolone because of an early onset of aGVHD (before day +21). Our finding of cholesterol dysregulation on day + 21 after allo-HCT is therefore hard to interpret; whether it is a marker of metabolic dysregulation preceding aGVHD development or, in some cases, a complication from immunosuppressive therapy or early introduced glucocorticoid therapy.

## 5. Conclusion

There are not many reports related to metabolic changes in patients with aGVHD. Our study of the untargeted metabolome has revealed a

potential link between lipid metabolism, specifically involving bile acid transformation and cholesterol synthesis, and the onset of aGVHD. The main limitations of the study are the small sample size, heterogeneity of the groups and several uncontrolled potential confounding factors regarding patients' characteristics i.e. presence of obesity, dyslipidemia, diabetes, and regarding treatment in the peri-transplantation period i.e. antibiotics and immunosuppressants use. Also, it is uncertain if the results reflect the allo-HCT impact on a metabolic profile or rather characterize the population of allo-HCT recipients and represent a risk factor for aGVHD development. This study's results need further research and validation but they direct the research in two directions: one is to further evaluate the relationship between aGVHD development and microbiota-derived metabolites such as glycocholic acid to understand aGVHD development and gain new tools for aGVHD prediction and monitoring. Another direction is the prevention of metabolic dysregulation in allo-HCT recipients e.g., hypolipidemic drugs or low-fat diet or aimed at preserving microbial diversity e.g., early fecal microbiota transplantation, prebiotics, and butyrate supplementation.

Conflict of interest: G.W.B. and J.B. are the owners of the Human Biome Institute which provides the means for fecal microbiota transplantation (FMT) procedures.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Medical University of Warsaw (protocol code KB/166/2017 from 5/09/2017).

#### CRedit authorship contribution statement

**Tyszka Martyna:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Styburski Daniel:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Maciejewska-Markiewicz Dominika:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft. **Tomaszewska Agnieszka:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Biliński Jarosław:** Supervision, Writing – review & editing. **Basak Grzegorz:** Conceptualization, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Stachowska Ewa:** Conceptualization, Writing – review & editing.

#### Declaration of Competing Interest

Conflict of interest: G.W.B. and J.B. are the owners of the Human Biome Institute which provides the means for fecal microbiota transplantation (FMT) procedures.

#### Acknowledgments

Acknowledgments: We want to thank our patients and medical staff, especially Ewa Wasiewicz for technical support. Financial Disclosure Statement This research was funded by the Polish National Science Centre, grant number 2018/29/N/NZ5/01779, competition PRELUDIUM 15.

#### References

- R.P. Gale, M.M. Bortin, D.W. van Bekkum, J.C. Biggs, K.A. Dicke, E. Gluckman, et al., Risk factors for acute graft-versus-host disease, *Br. J. Haematol.* 67 (4) (1987) 397–406.
- G.B. McDonald, L. Tabellini, B.E. Storer, R.L. Lawler, P.J. Martin, J.A. Hansen, Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment, *Blood* 126 (1) (2015) 113–120.
- S. Paczesny, O.I. Krijanovski, T.M. Braun, S.W. Choi, S.G. Clouthier, R. Kuick, et al., A biomarker panel for acute graft-versus-host disease, *Blood* 113 (2) (2009) 273–278.
- M.J. Hartwell, U. Özbek, E. Holler, A.S. Renteria, H. Major-Monfried, P. Reddy, et al., An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival, *JCI Insight* 2 (3) (2017) e89798.
- J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Metabonomics*, *Nature* 455 (7216) (2008) 1054–1056.
- H. Reikvam, K. Hatfield, Ø. Bruserud, The pretransplant systemic metabolic profile reflects a risk of acute graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation, *Metabonomics* (1) (2016) 12, 12.
- D., Jr Contaifer, C.H. Roberts, N.G. Kumar, R. Natarajan, B.J. Fisher, K. Leslie, et al., A preliminary investigation towards the risk stratification of allogeneic stem cell recipients with respect to the potential for development of GVHD via their pre-transplant plasma lipid and metabolic signature, *Cancers* 11 (8) (2019).
- X. Wu, Y. Xie, C. Wang, Y. Han, X. Bao, S. Ma, et al., Prediction of acute GVHD and relapse by metabolic biomarkers after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *JCI Insight* 3 (9) (2018).
- D. Michonneau, E. Latis, E. Curis, L. Dubouchet, S. Ramamoorthy, B. Ingram, et al., Metabonomics analysis of human acute graft-versus-host disease reveals changes in host and microbiota-derived metabolites, *Nat. Commun.* 10 (1) (2019) 5695.
- J.S. McCune, J.S. McKiernan, E. van Maarseveen, A.D.R. Huitema, T.W. Randolph, H. J. Deeg, et al., Prediction of acute graft versus host disease and relapse by endogenous metabolomic compounds in patients receiving personalized busulfan-based conditioning, *J. Proteome Res* 20 (1) (2021) 684–694.
- CSMS The original and most widely used metabolomic and lipidomic platform, accessed 23 December 2023, (<https://xcmsonline.scripps.edu>).
- M. Yuan, S.B. Breitkopf, X. Yang, J.M. Asara, A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue, *Nat. Protoc.* 7 (5) (2012) 872–881.
- E. Axén, H. Postlind, H. Sjöberg, K. Wikvall, Liver mitochondrial cytochrome P450 CYP27 and recombinant-expressed human CYP27 catalyze 1 alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (21) (1994) 10014–10018.
- N. Masuda, Deconjugation of bile salts by bacteroids and clostridium, *Microbiol Immunol.* 25 (1) (1981) 1–11.
- J.M. Jones, R. Wilson, P.M. Bealmeare, Mortality and gross pathology of secondary disease in germ-free mouse radiation chimeras, *Radiat. Res* 45 (3) (1971) 577–588.
- D.W. van Bekkum, J. Roodenburg, P.J. Heidt, D. van der Waaij, Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora, *J. Natl. Cancer Inst.* 52 (2) (1974) 401–404.
- R. Storb, R.L. Prentice, C.D. Buckner, R.A. Clift, F. Appelbaum, J. Deeg, et al., Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment, *N. Engl. J. Med* 308 (6) (1983) 302–307.
- F.B. Petersen, C.D. Buckner, R.A. Clift, N. Nelson, G.W. Counts, J.D. Meyers, et al., Infectious complications in patients undergoing marrow transplantation: a prospective randomized study of the additional effect of decontamination and laminar air flow isolation among patients receiving prophylactic systemic antibiotics, *Scand. J. Infect. Dis.* 19 (5) (1987) 559–567.
- R.R. Jenq, Y. Taur, S.M. Devlin, D.M. Ponce, J.D. Goldberg, K.F. Ahr, E.R. Littmann, L. Ling, A.C. Gbourne, L.C. Miller, M.D. Docampo, J.U. Peled, N. Arpaia, J.R. Cross, T.K. Peets, M.A. Lumish, Y. Shono, J.A. Dudakov, H. Poeck, A.M. Hanash, J. N. Barker, M.A. Perales, S.A. Giral, E.G. Pamer, M.R. van den Brink, Intestinal blauntia is associated with reduced death from graft-versus-host disease, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 21 (8) (2015) 1373–1383, <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.04.016>. Epub 2015 May 11. PMID: 25977230; PMCID: PMC4516127.
- Y. Taur, R.R. Jenq, M.A. Perales, E.R. Littmann, S. Morjaria, L. Ling, et al., The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Blood* 124 (7) (2014) 1174–1182.
- E. Holler, P. Butzhammer, K. Schmid, C. Hundsrucker, J. Koestler, K. Peter, et al., Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 20 (5) (2014) 640–645.
- X. Song, X. Sun, S.F. Oh, M. Wu, Y. Zhang, W. Zheng, et al., Microbial bile acid metabolites modulate gut RORγ(+) regulatory T cell homeostasis, *Nature* 577 (7790) (2020) 410–415.
- C. Campbell, P.T. McKenney, D. Konstantinovskiy, O.I. Isaeva, M. Schizas, J. Verter, et al., Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells, *Nature* 581 (7809) (2020) 475–479.
- S. Hang, D. Paik, L. Yao, E. Kim, J. Trinath, J. Lu, et al., Bile acid metabolites control T(H)17 and T(reg) cell differentiation, *Nature* 576 (7785) (2019) 143–148.
- M. Tyszka, D. Maciejewska-Markiewicz, J. Biliński, A. Lubas, E. Stachowska, G. W. Basak, Increased intestinal permeability and stool zonulin, calprotectin and beta-defensin-2 concentrations in allogeneic hematopoietic cell transplantation recipients, *Int J. Mol. Sci.* 23 (24) (2022) 15962.
- C. Out, A. Dijkers, A. Laskewitz, R. Boverhof, C. van der Ley, I.P. Kema, et al., Prednisolone increases enterohepatic cycling of bile acids by induction of Asbt and promotes reverse cholesterol transport, *J. Hepatol.* 61 (2) (2014) 351–357.
- Y. Xiao, W. Yan, K. Zhou, Y. Cao, W. Cai, Glucocorticoid treatment alters systemic bile acid homeostasis by regulating the biosynthesis and transport of bile salts, *Dig. Liver Dis.* 48 (7) (2016) 771–779.
- C.M. Theriot, A.A. Bowman, V.B. Young, Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for clostridium difficile spore germination and outgrowth in the large intestine, *mSphere* 1 (1) (2016) e00045-15, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00045-15>. PMID: 27239562; PMCID: PMC4863611.

- 29 E. Moghimipour, A. Ameri, S. Handali, Absorption-enhancing effects of bile salts, *Molecules* 20 (8) (2015) 14451–14473.
- 30 Y. Gu, J. Yin, Saturated fatty acids promote cholesterol biosynthesis: Effects and mechanisms, *Obes. Med.* 18 (2020) 100201.
- 31 B.W. Blaser, H.T. Kim, E.P. 3rd Alyea, V.T. Ho, C. Cutler, P. Armand, et al., Hyperlipidemia and statin use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 18 (4) (2012) 575–583.
- 32 A. Tichelli, C. Bucher, A. Rovó, G. Stussi, M. Stern, M. Paulussen, et al., Premature cardiovascular disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, *Blood* 110 (9) (2007) 3463–3471.
- 33 K.J. Hatfield, Ø. Bruserud, H. Reikvam, Pretransplant systemic lipidomic profiles in allogeneic stem cell transplant recipients, *Cancers* 14 (12) (2022).
- 34 M.L. Griffith, B.N. Savani, J.B. Boord, Dyslipidemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: evaluation and management, *Blood* 116 (8) (2010) 1197–1204.

---

## 8. Podsumowanie

W pracy przeglądowej pt. „*Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting*” (doi: 10.3390/jcm10112508), 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.

W pierwszej pracy oryginalnej z cyklu pt. „*Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients*” (doi: 10.3390/ijms232415962) przeprowadzono analizę przepuszczalności jelit za pomocą SAT oraz ocenę stężeń markerów uszkodzenia bariery jelitowej, tj. zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 w kale u pacjentów w okresie okołoprzeszczepowym. Oceniono także korelacje między poziomem zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 w kale a przepuszczalnością jelit, a także analizowano otrzymane dane w kierunku korelacji z częstością występowania głównych powikłań po allo-HCT tj. aGVHD, infekcji oraz zapalenia śluzówek. Głównymi ograniczeniami badania była mała liczba pacjentów, która po przystąpieniu do badania dostarczyła komplet próbek kału. U większości pacjentów poddawanych allo-HCT zwiększoną przepuszczalność jelit mierzoną jako LMR po SAT obserwowano już przed rozpoczęciem terapii kondycjonującej. Zaobserwowano istotny związek między podwyższonym LMR przed allo-HCT a wysokim HCT-CI. Zwiększenie przepuszczalności jelitowej u kandydatów do allo-HCT jest prawdopodobnie spowodowane stosowaniem antybiotyków, uszkodzeniem jelit w wyniku chemioterapii cytotoksycznej lub naciekami białaczkowymi. Ustalenia te są zgodne z wcześniej opublikowanymi pracami na chorych poddawanych chemioterapii cytotoksycznej z powodu nowotworów hematologicznych<sup>46,47,48</sup>. SAT jest testem referencyjnym do oceny przepuszczalności jelit, ma jednak swoje ograniczenia, tj. nie pozwala na rozróżnienie między zwiększoną przepuszczalnością połączeń ścisłych a uszkodzeniem enterocytów. Inne wady to uciążliwa konieczność 6-godzinnej zbiórki moczu oraz ryzyko wywołania biegunki. Z tego powodu SAT nie stał się przydatny w praktyce klinicznej. Celem naszej pracy była analiza innych potencjalnych biomarkerów przepuszczalności jelit u biorców allo-HCT. W ostatnich latach zonulina stała się jednym z najpopularniejszych markerów służących do oceny przepuszczalności jelita w wielu schorzeniach. Według naszej najlepszej wiedzy była to

---

pierwsza próba oceny stężeń zonuliny w kale u biorców allo-HCT, jednakże wyniki badania nie wykazały związku pomiędzy testem przepuszczalności, a stężeniem zonuliny w kale. Niespodziewanie stężenie zonuliny w kale było podwyższone przed rozpoczęciem kondycjonowania u większości pacjentów (88%) i istotnie spadało w dniu +7 po allo-HCT. W podgrupie pacjentów rozwijających aGVHD stężenia zonuliny były niższe niż u tych bez aGVHD, chociaż nie było to istotne statystycznie. Jak dotąd te wyniki są trudne do interpretacji. Jednym możliwym wyjaśnieniem jest to, że intensywne kondycjonowanie przed allo-HCT prowadzi do zniszczenia enterocytów i tym samym zaburza uwalnianie zonuliny do światła jelita. Rola zonuliny w rozwoju uszkodzenia bariery jelitowej i aGVHD w kontekście allo-HCT wymaga dalszej oceny, możliwej m.in. przez porównanie stężeń zonuliny w surowicy i kale przed i po kondycjonowaniu. Stężenie beta-defensyny-2 w kale to uznany wskaźnik stanu zapalnego jelit. O ile nam wiadomo, stężenie beta-defensyny-2 w kale nie było wcześniej oceniane u pacjentów poddawanych allo-HCT. W naszym badaniu mediana stężenia beta-defensyny-2 była niższa w okresie po przeszczepieniu, w porównaniu z okresem przed kondycjonowaniem, chociaż nie było to istotne statystycznie (prawdopodobnie ze względu na bardzo małą liczbę próbek do tej oceny). Dane z badań *in vitro* i na modelach zwierzęcych wskazują na funkcję ochronną beta-defensyny-2 podczas uszkodzenia bariery jelitowej<sup>49</sup>, dlatego można przypuszczać, że brak beta-defensyny-2, być może jest spowodowany uszkodzeniem nabłonka jelitowego i przyczynia się do dalszego uszkodzenia bariery jelitowej u naszych pacjentów. Jednak ta hipoteza wymaga weryfikacji w dalszych badaniach.

Łącznie 58% naszych pacjentów doświadczyło powikłań infekcyjnych w ciągu pierwszych 30 dni po allo-HCT, a 29% miało potwierdzoną bakteryjną infekcję na podstawie dodatnich hodowli próbek krwi lub moczu. Ponadto zauważono tendencję wskazującą, że ryzyko powikłań bakteryjnych było większe u pacjentów, u których wystąpił większy wzrost przepuszczalności jelitowej (wyrażonej jako  $\Delta$ LMR), co potwierdza wyniki wcześniejszych badań nad integralnością bariery jelitowej po allo-HCT, które wskazywały, że zmniejszona różnorodność mikrobioty w okresie peritransplantacyjnym zwiększała ryzyko bakteriemii<sup>17</sup>, infekcji płuc<sup>50</sup> i śmiertelności związanej z przeszczepieniem po allo-HCT (głównie aGVHD i infekcje)<sup>51</sup>.

Diagnoza aGVHD opiera się na objawach klinicznych potwierdzonych oceną histopatologiczną. Postawienie rozpoznania może być jednak problematyczne, ponieważ objawy GVHD są podobne do innych częstych powikłań występujących w okresie potransplantacyjnym, takich jak infekcje czy toksyczność leków. Dlatego też w ostatnich

---

latach istnieje ogromne zainteresowanie poszukiwaniem biomarkerów GVHD, które mogłyby ułatwić diagnozę, a także wyodrębnić grupę chorych narażoną na wyższe ryzyko wystąpienia tego powikłania. Jednym z potencjalnych markerów jest kalprotektyna w kale. W naszym badaniu u 16 pacjentów postawiono diagnozę aGVHD. Stężenia kalprotektyny dla całej grupy pacjentów po allo-HCT mieściły się w normie w trakcie całego okresu transplantacji, ale podgrupa pacjentów z aGVHD, w której oceniano stężenie kalprotektyny miała istotnie wyższe mediany stężeń tego biomarkera w kale w dniu +7 w porównaniu z pacjentami bez tej komplikacji.

Podsumowując, większość naszych pacjentów miała uszkodzoną barierę jelitową przed kondycjonowaniem, co korelowało z wyższym HCT-CI. Wzrost przepuszczalności bariery jelitowej oceniany jako LMR w dniu -7 poprzedzał dalsze uszkodzenie bariery jelitowej wyrażone jako  $\Delta$ LMR, a w kolejnych dniach pojawienie się infekcji bakteryjnych. W naszym badaniu stężenia zonuliny, kalprotektyny i beta-defensyny-2 nie korelowały z przepuszczalnością jelit wyrażoną jako LMR. Te dane są głównie wstępne, a rola markerów kału w ocenie przepuszczalności bariery jelitowej wymaga dalszych badań.

W publikacji „*Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*” (doi: 10.1016/j.leukres.2024.107435), przeprowadzono analizę metabolomu surowicy 38 pacjentów poddawanych allo-HCT, ze szczególnym uwzględnieniem 15 pacjentów, u których rozwinęła się aGVHD. Wykazano, że profil metaboliczny chorych z potwierdzoną diagnozą aGVHD istotnie różni się od profilu chorych bez tego powikłania i ta różnica widoczna jest już na 7 dni przed transplantacją. W kolejnym etapie zidentyfikowano metabolity, których stężenie istotnie różniło się między grupami, czyli metabolity szlaków lipidowych, obejmujących przekształcenia kwasów żółciowych m.in. kwas glikocholowy oraz metabolity syntezy cholesterolu. Kwas glikocholowy jest produktem transformacji pierwotnych kwasów żółciowych przez bakterie jelitowe. W badaniu udowodniono, że stężenie kwasu glikocholowego w surowicy były istotnie niższe w grupie z aGVHD zarówno przed jak i po allo-HCT, w porównaniu z pacjentami bez aGVHD. Jednym z możliwych wyjaśnień takiej różnicy może być zaburzona kompozycja mikrobiomu, czyli dysbioza obecna u tych pacjentów.

Głównymi ograniczeniami badania są niewielka liczba próbek, niehomogenność grup oraz obecność niekontrolowanych potencjalnych czynników zakłócających dotyczących pacjentów, takich jak otyłość, dyslipidemia, cukrzyca, a także związanych z leczeniem w okresie okołoprzeszczepowym, takich jak stosowanie antybiotyków i leków immunosupresyjnych. Należy jednak podkreślić, że zmiany metaboliczne związane z

---

aGVHD były obserwowane już przed allo-HCT. W pierwszej pracy oryginalnej z cyklu tj. „*Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients*” (doi: 10.3390/ijms232415962) zaburzenie bariery jelitowej pod postacią zwiększonego LMR u większości chorych także obserwowano już przed allo-HCT. Sugeruje to, że zmiany obserwowane po allo-HCT w barierze jelitowej lub metabolomie mogą nie być wyłącznie przypisane samej transplantacji, lecz możliwe, że wynikają z całości procedur terapeutycznych, w tym antybiotykoterapii, chemioterapii cytotoksycznej i podawania steroidów w okresie przedprzeszczepowym oraz leków immunosupresyjnych po allo-HCT. Wyniki tego pilotażowego badania wymagają dalszego potwierdzenia, ale kierują one badania w dwóch kierunkach: jeden to dalsza ocena związku między ryzykiem oraz rozwojem aGVHD a metabolitami lipidowymi, oraz metabolitami pochodzącymi z mikrobioty, takimi jak kwas glikocholowy, w celu głębszego poznania etiopatogenezy aGVHD i uzyskania nowych narzędzi do przewidywania i monitorowania aGVHD. Drugi kierunek to zapobieganie dysregulacji metabolicznej u biorców allo-HCT, przy pomocy m.in. leków hipolipidemicznych, niskotłuszczowej diety lub dążenia do zachowania różnorodności mikroorganizmów, np. poprzez wczesny transfer mikrobioty jelitowej od zdrowych dawców czy stosowanie prebiotyków.

## 9. Wnioski

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

---

## 10. Piśmiennictwo

- [1] Niederwieser D, Baldomero H, Bazuaye N, Bupp C, Chaudhri N, Corbacioglu S, Elhaddad A, Frutos C, Galeano S, Hamad N, Hamidieh AA, Hashmi S, Ho A, Horowitz MM, Iida M, Jaimovich G, Karduss A, Kadera Y, Kröger N, Péffault de Latour R, Lee JW, Martínez-Rolón J, Pasquini MC, Passweg J, Paulson K, Seber A, Snowden JA, Srivastava A, Szer J, Weisdorf D, Worel N, Koh MBC, Aljurf M, Greinix H, Atsuta Y, Saber W. One and a half million hematopoietic stem cell transplants: continuous and differential improvement in worldwide access with the use of non-identical family donors. *Haematologica*. 2022 May 1;107(5):1045-1053. doi: 10.3324/haematol.2021.279189. PMID: 34382386; PMCID: PMC9052915.
- [2] Wiktor-Jedrzejczak W, Szczylik C, Pojda Z, Siekierzynski M, Kansy J, Klos M, Ratajczak MZ, Pejcz J, Jaskulski D, Gornas P. Success of bone marrow transplantation in congenital Diamond-Blackfan anaemia: a case report. *Eur J Haematol*. 1987 Feb;38(2):204-6. doi: 10.1111/j.1600-0609.1987.tb01163.x. PMID: 3109937.
- [3] Strona internetowa POLTRANSPLANT [www.poltransplant.org.pl/statystyka\\_2023](http://www.poltransplant.org.pl/statystyka_2023), accessed on 18.01.2024
- [4] Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-9.
- [5] J.R. Passweg, H. Baldomero, P. Bader, et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants *Bone Marrow Transplant*, 50 (2015), pp. 476-482
- [6] Sebastian Giebel Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2021 rok Tom 2, 3.1. Przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych,
- [7] R.P. Gale, M.M. Bortin, D.W. van Bekkum, J.C. Biggs, K.A. Dicke, E. Gluckman, et al., Risk factors for acute graft-versus-host disease, *Br. J. Haematol*. 67 (4) (1987) 397–406.
- [8] Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, Ordemann R, Qayed M, Renteria AS, Reshef R, Wöfl M, Chen YB, Goldstein S, Jagasia M, Locatelli F, Mielke S, Porter D, Schechter T, Shekhovtsova Z, Ferrara JL, Levine JE. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):4-10. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.001. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26386318; PMCID: PMC4706482.
- [9] Jamil MO, Mineishi S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol*. 2015 May;101(5):452-66. doi: 10.1007/s12185-015-1785-1. Epub 2015 Apr 12. PMID: 25864189.
- [10] Vancamelbeke M., Vermeire S. The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2017;11:821–834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143.
- [11] Hartsock, A.; Nelson, W.J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1778, 660–669



- 
- [12] Romero, E.S.; Cotoner, C.A.; Camacho, C.P.; Bedmar, M.C.; Vicario, M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2015, 107, 686–696.
- [13] Poyet M., Groussin M., Gibbons S.M., Avila-Pacheco J., Jiang X., Kearney S.M., Perrotta A.R., Berdy B., Zhao S., Lieberman T.D., et al. A library of human gut bacterial isolates paired with longitudinal multiomics data enables mechanistic microbiome research. *Nat. Med.* 2019;25:1442–1452. doi: 10.1038/s41591-019-0559-3.
- [14] Muniz, L.R.; Knosp, C.; Yeretssian, G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front. Immunol.* 2012, 3, 310.
- [15] Furusawa, Y.; Obata, Y.; Fukuda, S.; Endo, T.A.; Nakato, G.; Takahashi, D.; Nakanishi, Y.; Uetake, C.; Kato, K.; Kato, T.; et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013, 504, 446–450
- [16] Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, Rossignol DP, Ferrara JL. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* 2001 Jun;107(12):1581-9. doi: 10.1172/JCI12156
- [17] Jenq R.R., Ubeda C., Taur Y., Menezes C.C., Khanin R., Dudakov J., Liu C., West M.L., Singer N.V., Equinda M.J., et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 2012;209:903–911. doi: 10.1084/jem.20112408. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [18] Mathewson N.D., Jenq R., Mathew A.V., Koenigskecht M., Hanash A., Toubai T., Oravec-Wilson K., Wu S.-R., Sun Y., Rossi C., et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 2016;17:505–513. doi: 10.1038/ni.3400. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [19] Taur Y., Xavier J., Lipuma L., Ubeda C., Goldberg J., Gobourne A., Lee Y.J., Dubin K.A., Succi N.D., Viale A., et al. Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2012;55:905–914. doi: 10.1093/cid/cis580. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [20] Jenq R.R., Taur Y., Devlin S.M., Ponce D.M., Goldberg J.D., Ahr K.F., Littmann E.R., Ling L., Gobourne A.C., Miller L.C., et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1373–1383. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [21] Holler E., Butzhammer P., Schmid K., Hundsrucker C., Koestler J., Peter K., Zhu W., Sporrer D., Hehlhans T., Kreutz M., et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014;20:640–645. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.030. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [22] Shono Y., Docampo M.D., Peled J.U., Perobelli S.M., Velardi E., Tsai J.J., Slingerland A.E., Smith O.M., Young L.F., Gupta J., et al. Increased GVHD-related mortality with

- 
- broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci. Transl. Med.* 2016;8:339ra71. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf2311. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [23] Bjarnason I., Macpherson A., Hollander D. Intestinal permeability: An overview. *Gastroenterology.* 1995;108:1566–1581. doi: 10.1016/0016-5085(95)90708-4
- [24] Johansson, J.E.; Brune, M.; Ekman, T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, hemotopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2001, 28, 737–742.
- [25] Blijlevens, N.M.A.; Donnelly, J.P.; M'Rabet, L.; De Pauw, B.E.; Land, B.V. Measuring mucosal damage induced by cytotoxic therapy. *Support. Care Cancer* 2004, 12, 227–233.
- [26] Blijlevens NM, Donnelly JP, de Pauw BE. Prospective evaluation of gut mucosal barrier injury following various myeloablative regimens for haematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Apr;35(7):707-11. doi: 10.1038/sj.bmt.1704863. PMID: 15785771.
- [27] Fasano A. Physiological, Pathological, and Therapeutic Implications of Zonulin-Mediated Intestinal Barrier Modulation: Living Life on the Edge of the Wall. *Am. J. Pathol.* 2008;173:1243–1252.
- [28] Wang W., Uzzau S., Goldblum S.E., Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Pt 24J. Cell. Sci.* 2000;113:4435–4440. doi: 10.1242/jcs.113.24.4435.
- [29] Fasano A. Intestinal Permeability and Its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;10:1096–1100.
- [30] Nocerino R., De Filippis F., Cecere G., Marino A., Micillo M., Di Scala C., de Caro C., Calignano A., Bruno C., Paparo L., et al. The therapeutic efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12(®) in infant colic: A randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020;51:110–120.
- [31] Siljander H., Jason E., Ruohtula T., Selvenius J., Koivusaari K., Salonen M., Ahonen S., Honkanen J., Ilonen J., Vaarala O., et al. Effect of Early Feeding on Intestinal Permeability and Inflammation Markers in Infants with Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *J. Pediatr.* 2021;238:305–311.e3.
- [32] Savilahti E.M., Kukkonen A.K., Tuure T., Kuitunen M., Haahtela T. Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy.* 2011;42:405–411.
- [33] Nocerino R., Paparo L., Terrin G., Pezzella V., Amoroso A., Cosenza L., Cecere G., De Marco G., Micillo M., Albano F., et al. Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* 2017;36:118–125
- [34] Silberer H., Küppers B., Mickisch O., Baniewicz W., Drescher M., Traber L., Kempf A., Schmidt-Gayk H. Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin. Lab.* 2005;51:117–126.

- 
- [35] Aasebo A.T., Gedde-Dahl T., Reims H.M., Baekkevold E.S., Jahnsen F.L. Calprotectin Expressing Donor-Derived Macro-phages Increase in Acute Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease. *Transplant. Cell. Ther.* 2022;28:248-e1.
- [36] Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment, *Blood* 126 (1) (2015) 113–120.
- [37] S. Paczesny, O.I. Krijanovski, T.M. Braun, S.W. Choi, S.G. Clouthier, R. Kuick, et al., A biomarker panel for acute graft-versus-host disease, *Blood* 113 (2) (2009) 273–278.
- [38] M.J. Hartwell, U. "Ozbek, E. Holler, A.S. Renteria, H. Major-Monfried, P. Reddy, et al., An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival, *JCI Insight* 2 (3) (2017) e89798.
- [39] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Metabonomics*, *Nature* 455 (7216) (2008) 1054–1056.
- [40] Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites*. 2012; 2(4):775-795.
- [41] Słowikowska A, Toczyłowska B, Cichoń R, Hendzel P. *Metabolomika — chemiczny „odcisk palca” i istotny element medycyny spersonalizowanej*. *Folia Cardiologica* 2016;11(4):353-358.
- [42] H. Reikvam, K. Hatfield, Ø. Bruserud, The pretransplant systemic metabolic profile reflects a risk of acute graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation, *Metabolomics* (1) (2016) 12, 12
- [43] Contaifer D Jr, Roberts CH, Kumar NG, Natarajan R, Fisher BJ, Leslie K, Reed J, Toor AA, Wijesinghe DS. A Preliminary Investigation towards the Risk Stratification of Allogeneic Stem Cell Recipients with Respect to the Potential for Development of GVHD via Their Pre-Transplant Plasma Lipid and Metabolic Signature. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul 25;11(8):1051.
- [44] X. Wu, Y. Xie, C. Wang, Y. Han, X. Bao, S. Ma, et al., Prediction of acute GVHD and relapse by metabolic biomarkers after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *JCI Insight* 3 (9) (2018).
- [45] D. Michonneau, E. Latis, E. Curis, L. Dubouchet, S. Ramamoorthy, B. Ingram, et al., Metabolomics analysis of human acute graft-versus-host disease reveals changes in host and microbiota-derived metabolites, *Nat. Commun.* 10 (1) (2019) 5695.
- [46] J.S. McCune, J.S. McKiernan, E. van Maarseveen, A.D.R. Huitema, T.W. Randolph, H.
- [47] J. Deeg, et al., Prediction of acute graft versus host disease and relapse by endogenous metabolomic compounds in patients receiving personalized busulfan based conditioning, *J. Proteome Res* 20 (1) (2021) 684–694.
- [48] Sundström G.M., Wahlin A., Nordin-Andersson I., Suhr O.B. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leu-kemia. *Eur. J. Haematol.* 1998;61:250–254. doi: 10.1111/j.1600-0609.1998.tb01710.x.
- [49] Sundström G.M., Wahlin A., Nordin-Andersson I., Suhr O.B. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leu-kemia. *Eur. J. Haematol.* 1998;61:250–254. doi: 10.1111/j.1600-0609.1998.tb01710.x.
- [50] Sundström G.M., Wahlin A., Nordin-Andersson I., Suhr O.B. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leu-kemia. *Eur. J. Haematol.* 1998;61:250–254. doi: 10.1111/j.1600-0609.1998.tb01710.x.

- 
- [51] Fusco A., Savio V., Donniacuo M., Perfetto B., Donnarumma G. Antimicrobial Peptides Human Beta-Defensin-2 and -3 Protect the Gut During *Candida albicans* Infections Enhancing the Intestinal Barrier Integrity: In Vitro Study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11:486. doi: 10.3389/fcimb.2021.666900
- [52] Harris B., Morjaria S.M., Littmann E.R., Geyer A.I., Stover D.E., Barker J.N., Giralt S.A., Taur Y., Pamer E.G. Gut Microbiota Predict Pulmonary Infiltrates after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2016;194:450–463.
- [53] Taur Y., Jenq R., Perales M.-A., Littmann E.R., Morjaria S., Ling L., No D., Gbourne A., Viale A., Dahi P., et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2014;124:1174–1182.

## 11. Opinia Komisji Bioetycznej



### Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/.../2017

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
w dniu 05 września 2017 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

**Lek. Martyna Tyszka**  
**Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych**  
**Ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa**

**dotyczącym:** wyrażenia opinii w sprawie badania pt „Badanie zmian przepuszczalności bariery jelitowej po przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (HCT)”.

wyraża następującą  
opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*


**Uwagi Komisji – verte**

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .










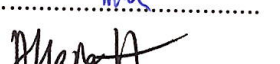
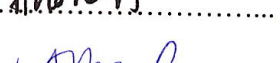


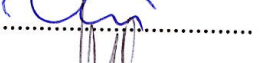
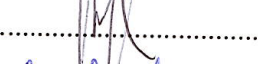
W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

  
Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Wierzbicki

\*niepotrzebne skreślić

strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim  
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....196..... z dnia 05 września 2017r.

1. Prof. dr hab. med. Zbigniew WIERZBICKI 
2. Prof. dr hab. Barbara GAJKOWSKA 
3. Prof. dr hab. med. Jadwiga KOMENDER 
4. Prof. dr hab. med. Bożenna WOCIAL 
5. Prof. nadzw. dr hab. med. Andrzej KAŃSKI 
6. Prof. dr hab. med. Jadwiga DWILEWICZ-TROJACZEK 
7. Prof. dr hab. med. Krzysztof J. FILIPIAK 
8. Dr n. med. Zygmunt JAMROZIK 
9. Dr hab. n. med. Mariusz JASIK 
10. Dr hab. n. med. Andrea HORVATH-STOLARCZYK 
11. Dr Agnieszka PIECHAL 
12. Mec. Ryszard PŁACZKOWSKI 
13. Prof. dr hab. Joanna GÓRNICKA-KALINOWSKA 
14. Alicja JAWORSKA 
15. Ksiądz Władysław GRĘDOWSKI 

## 12. Oświadczenia współautorów

Prof. dr hab. med. Grzegorz Władysław Basak

Warszawa 25.01.2024

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt *Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting*. *J Clin Med*. 2021 Jun 6;10(11):2508. oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 10%.

Wkład Martynty Tyszki określam jako 80%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury oraz przygotowanie manuskryptu.

Jako współautor pracy pt *Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients*. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 15;23(24):15962. oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przygotowanie koncepcji i metodyki, nadzór nad prowadzeniem badań, krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 7%.

Wkład Martynty Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, uzyskanie zgody komisji bioetycznej oraz finansowania, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Jako współautor pracy pt. *Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. (doi:10.1016/j.leukres.2024.107435) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 8%.

Wkład Martynty Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionych prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Martynty Tyszki.

  
KIEROWNIK  
Kliniki Hematologii  
Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
prof. dr hab. med. Grzegorz W. Basak

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. (doi: 10.3390/ijms232415962) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 2%.

Wkład Martyny Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, uzyskanie zgody komisji bioetycznej oraz finansowania, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Jako współautor pracy pt. Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. (doi:10.1016/j.leukres.2024.107435) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 2%.

Wkład Martyny Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionych prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Martyny Tyszki.





## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt *Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients*. Int J Mol Sci. 2022 Dec 15;23(24):15962. oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza statystyczna, interpretacja wyników, krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 10%.

Wkład Martynty Tyski określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, uzyskanie zgody komisji bioetycznej oraz finansowania, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy jako części rozprawy doktorskiej lek. Martynty Tyski.

Prof. dr hab. n. med. Arkadiusz Lubas  
specjalista chorób wewnętrznych, neurologii  
hipertensjologii i endokrynologii  
lekarz nr PWZ3194606

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. (doi:10.1016/j.leukres.2024.107435) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 2%.

Wkład Martyny Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionych prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Martyny Tyszki.

*Daniel Styburski*


OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. (doi:10.1016/j.leukres.2024.107435) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 2%.

Wkład Martyny Tyski określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionych prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Martyny Tyski.

dr n. med. Agnieszka Tomaszewska  
specjalista chorób wewnętrznych  
hematologii, immunologii  
i transplantologii klinicznej  
1697180



## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting" J Clin Med. 2021 Jun 6;10(11):2508. oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 10%.

Wkład Martyny Tyszkowej określam jako 80%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury oraz przygotowanie manuskryptu.

Jako współautor pracy pt. Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. Int J Mol Sci. 2022 Dec 15;23(24):15962. oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór nad prowadzeniem badań, krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 5%.

Wkład Martyny Tyszkowej określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, uzyskanie zgody komisji bioetycznej oraz finansowania, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Jako współautor pracy pt. Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. (doi:10.1016/j.leukres.2024.107435) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 3%.

Wkład Martyny Tyszkowej określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionych prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Martyny Tyszkowej.

*Biliński J*



Dokument podpisany  
przez Jarosław Józef  
Biliński  
Data: 2024.01.25  
15:16:46 CET  
Położenie: Warszawa; PL

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. (doi: 10.3390/ijms232415962) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzanie analiz laboratoryjnych, analiza wyników, wizualizacja wyników, krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 10%.

Wkład Martynty Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, uzyskanie zgody komisji bioetycznej oraz finansowania, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Jako współautor pracy pt. Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. (doi:10.1016/j.leukres.2024.107435) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza i interpretacja wyników, krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 10%.

Wkład Martynty Tyszki określam jako 65%, obejmował on przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionych prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Martynty Tyszki.

*Dominika  
Maciejewska-Markiewicz*

## OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting*. *J Clin Med*. 2021 Jun 6;10(11):2508, oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury oraz przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 80%.

Jako współautorka pracy pt. *Increased Intestinal Permeability and Stool Zonulin, Calprotectin and Beta-Defensin-2 Concentrations in Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients*. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 15;23(24):15962, oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przygotowanie koncepcji i metodyki, przegląd literatury, uzyskanie zgody komisji bioetycznej oraz finansowania, nadzór nad zbieraniem materiału i przeprowadzaniem analiz laboratoryjnych, przygotowanie i aktualizacja bazy danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 65%.

Jako współautorka pracy pt. *Altered lipid metabolism in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. *Leuk Res*. 2024 Jan 5;137:107435, oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna rewizja i ostateczne poprawki pracy. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji określam jako 65%.