

# AUTOREFERAT



**Dr n. med. Jarosław Biliński**

**Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych**

**Warszawski Uniwersytet Medyczny**

# AUTOREFERAT

## Spis treści

- I. DANE OSOBOWE
- II. POSIADANE DYPLOMY
- III. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU
- IV. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYZSZYM I NAUCE (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).
  - a. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO I WYKAZ PRAC
  - b. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW
  - c. WNIOSKI
  - d. MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA WYNIKÓW BADAŃ
- V. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI
  - a. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO NA PODSTAWIE ANALIZY BIBLIOMETRYCZNEJ
  - b. OPIS AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ POZA OSIĄGNIĘCIEM O KTÓRYM MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY
- VI. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ
  - a. OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE
  - b. DYDAKTYKA
  - c. UDZIAŁ W KONFERENCJACH
  - d. AUTORSTWO I ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH NAUKOWYCH
- VII. INNE

## 1. DANE OSOBOWE

**Imię i nazwisko:** Jarosław Biliński

**Stopień naukowy:** Doktor nauk medycznych

**Adres służbowy:** Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1a, blok D, IV piętro, 02-097 Warszawa

## 2. POSIADANE DYPLOMY

2017	<b>Stopień naukowy doktora nauk medycznych, wyróżniona rozprawa doktorska</b> pt. „Kolonizacja jelit przez bakterie antybiotykooporne u chorych na nowotwory układu krwiotwórczego: znaczenie kliniczne i strategia postępowania” Promotor: prof. dr hab. n. med. Grzegorz Basak Recenzenci: prof. dr hab. n. med. Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat oraz prof. dr hab. n. med. Jan Styczyński
2013	<b>Dyplom lekarza</b> Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (1 miejsce za najwyższą średnią ukończenia studiów wśród absolwentów w 2013 roku)

## 3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

12/2014 – 08/2021	<b>Lekarz rezydent, specjalizacja z hematologii</b> Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny WUM – obecnie CSK UCK WUM (1 miejsce w rekrutacji na Mazowszu w danym roku)
od 09/2018	<b>Stanowisko Asystent</b> Katedra Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

10/2014 – 11/2017	<b>Studia doktoranckie</b> Katedra i Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, (II miejsce w rekrutacji, studia III stopnia ukończone rok przed terminem z przyspieszonym zdaniem wszystkich egzaminów)
10/2013 – 10/2014	<b>Lekarz stażysta</b> Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny (obecnie CSK Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego)

**4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2  
USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM  
I NAUCE (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

**a. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO I WYKAZ PRAC**

**TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: „Znaczenie mikrobioty jelitowej, jej przeszczepiania, preparatyki i parametrów jakościowych w profilaktyce i leczeniu choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi u pacjentów po przeszczepieniu szpiku”**

Cykl obejmuje 5 powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

**Sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) osiągnięcia naukowego: 42,016**

**Sumaryczna punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) osiągnięcia naukowego: 660 punktów**

**Wykaz prac:**

- 1) **Bilinski J**, Dziurzynski M, Grzesiowski P, Podsiadly E, Stelmaszczyk-Emmel A, Dzieciatkowski T, Dziewit L, Basak GW. Multimodal Approach to Assessment of Fecal Microbiota Donors based on Three Complementary Methods. J Clin Med. 2020; 9(7):2036. doi: 10.3390/jcm9072036. PMID: 32610522; PMCID: PMC7409046.

**IF: 4,242**  
**MEiN: 140 pkt**

*Mój udział w powstaniu publikacji polegał na nawiązaniu współpracy międzyosrodkowej, opracowaniu koncepcji, założeń badania/analiz, metodyki pracy, postawieniu hipotez badawczych, analizie piśmiennictwa, zbieraniu i ujednolicaniu danych, przeprowadzeniu analiz statystycznych, interpretacji wyników, napisaniu całości manuskryptu, świadomym przyjęciu odpowiedzialności za wszystkie aspekty pracy, przygotowaniu pracy pod wymogi czasopisma, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Rola wiodąca.*

- 2) **Bilinski J**, Dziurzynski M, Grzesiowski P, Podsiadly E, Stelmaszczyk-Emmel A, Dzieciatkowski T, Lis K, Tyszka M, Ozieranski K, Dziewit Ł, Basak GW. Fresh Versus Frozen Stool for Fecal Microbiota Transplantation-Assessment by Multimethod Approach Combining Culturing, Flow Cytometry, and Next-Generation Sequencing. *Front Microbiol.* 2022; 13:872735. doi: 10.3389/fmicb.2022.872735. PMID: 35847075; PMCID: PMC9284506.

**IF: 6,064**  
**MEiN: 100 pkt**

*Mój udział w powstaniu publikacji polegał na nawiązaniu współpracy międzyosrodkowej, opracowaniu koncepcji, założeń badania/analiz, metodyki pracy, postawieniu hipotez badawczych, analizie piśmiennictwa, zbieraniu i ujednolicaniu danych, przeprowadzeniu analiz statystycznych, interpretacji wyników, napisaniu całości manuskryptu, świadomym przyjęciu odpowiedzialności za wszystkie aspekty pracy, przygotowaniu pracy pod wymogi czasopisma, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Rola wiodąca.*

- 3) **Bilinski J**, Lis K, Tomaszewska A, Grzesiowski P, Dzieciatkowski T, Tyszka M, Karakulska-Prystupiuik E, Boguradzki P, Tormanowska M, Halaburda K, Waszczuk-Gajda A, Wiktor-Jedrzejczak W, Basak GW. 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(3):E88-E91. doi: 10.1002/ajh.26077. PMID: 33326127.

**IF: 13,268**

**MEiN: 140 pkt**

*Mój udział w powstaniu publikacji polegał na przygotowaniu protokołu leczenia pacjentów, nawiązaniu współpracy międzyośrodkowej, opracowaniu koncepcji, założeń badania/analiz, metodyki pracy, postawieniu hipotez badawczych, analizie piśmiennictwa, zbieraniu i ujednolicaniu danych, przeprowadzeniu analiz statystycznych, interpretacji wyników, przygotowaniu tabel i rycin, napisaniu całości manuskryptu, świadomym przyjęciu odpowiedzialności za wszystkie aspekty pracy, przygotowaniu pracy pod wymogi czasopisma, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Rola wiodąca.*

- 4) **Biliński J**, Jasiński M, Tomaszewska A, Lis K, Kacprzyk P, Chmielewska L, Karakulska-Prystupiuł E, Mullish BH, Basak GW. Fecal microbiota transplantation with ruxolitinib as a treatment modality for steroid-refractory/dependent acute, gastrointestinal graft-versus-host disease: A case series. *Am J Hematol.* 2021; 96(12):E461-E463. doi: 10.1002/ajh.26365. PMID: 34587331.

**IF: 13,268**

**MEiN: 140 pkt**

*Mój udział w powstaniu publikacji polegał na przygotowaniu protokołu leczenia pacjentów, nawiązaniu współpracy międzyośrodkowej, opracowaniu koncepcji, założeń badania/analiz, metodyki pracy, postawieniu hipotez badawczych, analizie piśmiennictwa, zbieraniu i ujednolicaniu danych, przeprowadzeniu analiz statystycznych, interpretacji wyników, przygotowaniu tabel i rycin, napisaniu całości manuskryptu, świadomym przyjęciu odpowiedzialności za wszystkie aspekty pracy, przygotowaniu pracy pod wymogi czasopisma, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Rola wiodąca.*

- 5) Qiao X, **Biliński J [współ-pierwszy autor i autor korespondencyjny]**, Wang L, Yang T, Luo R, Fu Y, Yang G. Safety and efficacy of fecal microbiota transplantation in the treatment of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2023 Jan;58(1):10-19. doi: 10.1038/s41409-022-01824-1. PMID: 36167905.

**IF: 5,174**

**MEiN: 140 pkt**

*Moja rola w powstaniu publikacji polegała na opracowaniu koncepcji i założeń pracy, nawiązaniu współpracy międzyośrodkowej, nadzorowaniu analiz i kierowaniu zespołem analitycznym prowadzącym metaanalizę, krytycznej analizie wyników, napisaniu manuskryptu, świadomym przyjęciu odpowiedzialności za wszystkie aspekty pracy, przygotowaniu pracy pod wymogi czasopisma, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Rola wiodąca wraz z drugim pierwszym autorem.*

## **b. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW**

### **WPROWADZENIE**

Ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (acute graft-versus-host disease, aGvHD) jest częstym, zagrażającym życiu powikłaniem po przeszczepieniu allogenicznych hematopoetycznych komórek krwiotwórczych (alloHCT), które występuje u 25 do 50% biorców alloHCT i jest drugą najczęstszą przyczyną śmierci (po nawrocie choroby podstawowej) w tej grupie chorych [1,2]. Pomimo tego, że jej częstość występowania zmniejszała się z czasem w przypadku transplantacji od w pełni zgodnych spokrewnionych i niespokrewnionych dawców szpiku, bezwzględna liczba pacjentów doświadczających aGvHD wzrosła z powodu rosnącej liczby alloHCT wykonywanych na całym świecie [3]. Nasila się również manifestacja żołądkowo-jelitowa aGvHD, co udowodniono na przestrzeni ostatnich dekad [4] i co może mieć bezpośrednio związek ze stosowaniem profilaktyki antybiotykowej przed zabiegami alloHCT i zubożeniem mikrobiomu jelitowego. Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi występuje, gdy immunokompetentne limfocyty T w przeszczepie rozpoznają tkanki biorcy jako obce i inicjują odpowiedź immunologiczną. Główne objawy pojawiają się na skórze (wysypka plamisto-grudkowa), wątrobie (zastój żółci w wyniku uszkodzenia małych dróg żółciowych) i przewodzie pokarmowym (wodnista lub krwista biegunka, nudności, wymioty, kurczowe bóle brzucha). Diagnoza może być czasami trudna z powodu nakładających się objawów związanych z toksycznością kondycjonowania i współistniejącymi infekcjami. Rozpoznanie kliniczne można postawić na podstawie typowych objawów, badań laboratoryjnych i biopsji tkanek, które należy analizować z ostrożnością ze względu na stosunkowo częste wyniki fałszywie ujemne i fałszywie dodatnie [5–7]. Czynnikiem ryzyka dla aGvHD są stopień niezgodności w HLA, zaawansowany wiek zarówno

dawcy, jak i biorcy, przeszczep od dawcy niespokrewnionego, przeszczep od dawcy płci żeńskiej do biorcy płci męskiej, przeszczep otrzymany z krwi obwodowej oraz intensywność schematu kondycjonowania [8 –10]. Zapobieganie GvHD obejmuje podawanie globuliny antytymocytarnej (ATG), inhibitorów kalcyneuryny (cyklosporyna lub takrolimus) oraz metotreksatu (antagonista kwasu foliowego) lub mykofenolanu mofetylu [11,12]. Ostra GvHD jest leczona glikokortykosteroidami, ale oporność na steroidy lub sterydozależność są stosunkowo częste i tylko 40–60% pacjentów odpowiada na tę terapię [13]. Nadal nie ma konsensusu co do najlepszego leczenia drugiego rzutu, a śmiertelność u pacjentów niereagujących na steroidy jest wysoka, z sześciomiesięcznym całkowitym przeżyciem szacowanym na 50% i dwuletnim całkowitym przeżyciem wynoszącym maksymalnie 30% [14,15]. W 2020 roku autorzy randomizowanego badania klinicznego opublikowanego w *New England Journal of Medicine* po raz pierwszy (od dekad braku pozytywnych wyników jakichkolwiek badań w leczeniu drugiej linii) udokumentowali, że interwencja ruksolitynibem u chorych z oporną na steroidy aGvHD skutkowała statystycznie wyższym odsetkiem całkowitych odpowiedzi niż leczenie standardowe [16].

Wśród innych najczęściej stosowanych metod leczenia drugiego rzutu są ATG [17], potransplantacyjny cyklofosfamid [18], etanercept [19], infliksymab [20], czy fotoferezy pozaustrojowe.

Aby podjąć próby znalezienia nowych metod leczenia i profilaktyki aGvHD niezbędne jest dokładne poznanie biologii tego powikłania. Jest to bowiem skomplikowany proces immunologiczny, w którym aktywowanych jest bardzo wiele ścieżek sygnałowych. Biologia choroby została, głównie dzięki zaawansowanym technologicznie badaniom naukowym, w znacznej mierze określona. Patogeneza aGvHD opiera się na zjawisku błędnego koła – inicjacja choroby pojawia się, gdy w wyniku chemioterapii kondycjonującej i następowym uszkodzeniom nabłonków i tkanek, głównie przewodu pokarmowego (jako, że chemioterapia czy radioterapia uszkadza głównie komórki często dzielące się, a takimi poza komórkami krwiotwórczymi isą przede wszystkim komórki przewodu pokarmowego) limfocyty T pochodzące od dawcy zostają aktywowane przeciwko tkankom gospodarza („wystawionym” niejako „masowo: przez komórki prezentujące antygen), co z kolei uwalnia molekularne sygnały uszkodzenia (danger-associated molecular patterns, DAMPS), które dalej aktywują limfocyty T i nakręcają proces zapalny, niszczenia tkanek. W patogenezie aGvHD wyróżnia się trzy powszechnie znane etapy [21,22]. Podczas pierwszego etapu, który wiąże się z uszkodzeniem tkanek, uwalniane są cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) czy interleukina-1 (IL-1). Schemat kondycjonowania przed



przeszczepieniem, infekcje lub inne procesy zapalne przed przeszczepieniem są w głównej mierze odpowiedzialne za stopień uszkodzenia tkanek. Uwolnione cytokiny pełnią rolę „sygnałów zagrożenia”, które uważane są za wyzwalacze agresywnej odpowiedzi immunologicznej w patogenezie aGvHD [23]. Co ciekawe, przewód pokarmowy odgrywa istotną, o ile nie główną, rolę w procesie uwalniania cytokin i całym procesie inicjacji aGvHD [24]. Komórki, o których wiadomo, że są szczególnie uszkodzane podczas terapii kondycjonującej, to komórki Panetha i kubkowe. Komórki Panetha są odpowiedzialne za wydzielanie alfa-defensyn, które są peptydami przeciwbakteryjnymi, utrzymującymi odpowiednią równowagę w składzie mikrobioty jelitowej [25]. Utrata tych komórek skutkuje dysbiozą jelitową [26]. Komórki kubkowe wydzielają mucynę, która chroni komórki nabłonka jelit (intestinal epithelial cells, IEC) przed bakteriami, antygenami światła jelita [27]. Uszkodzenie tych komórek powoduje utratę integralności IEC i umożliwia translokację drobnoustrojów jelitowych i całego ładunku antygenowego jelit (metabolitów, peptydów i białek) do błony podśluzowej, węzłów chłonnych i krwioobiegu. To w konsekwencji zwiększa produkcję cytokin prozapalnych i stymuluje samą GvHD [28]. Klinicznie największy niepokój co do późniejszego wyzwolenia aGvHD budzi właśnie stopień uszkodzenia przewodu pokarmowego podczas procedury alloHCT.

Po podaniu komórek krwiotwórczych pacjentowi, po zakończeniu kondycjonowania (wykonaniu alloHCT) rozpoczyna się etap drugi. Komórki T dawcy powracają do tkanek limfatycznych w ciągu kilku godzin po przeszczepieniu szpiku. Po 2–3 dniach komórki prezentujące antygen gospodarza (APC) prowadzą do aktywacji limfocytów T dawcy, proliferacji i wydzielania cytokin [29]. Dane sugerują, że głównie zaangażowane w ten proces są niehematopoetyczne APC [30]. Dodatkowo limfocyty T różnicują się w cytotoksyczne komórki T (Tc) typu Th1 oraz limfocyty Th17, które wytwarzają  $TNF\alpha$ , IL-2 i  $IFN\gamma$ , co wzmacnia prezentację antygenów [31]. Wszystko to prowadzi do infiltracji cytotoksycznych komórek T w narządach docelowych, takich jak wątroba, przewód pokarmowy i skóra [29]. Przewód pokarmowy stanowi jedną z barier chroniących nas przed środowiskiem, a także jest największym przedziałem komórek immunokompetentnych. Błona śluzowa przewodu pokarmowego (gut-associated lymphoid tissue, GALT) jest uważana za największy ludzki narząd limfatyczny. W drugim etapie wszystkie APC masowo prezentują antygeny (własne i obce) dojrzałym komórkom T dawcy, aktywując w ten sposób inwazję i uszkodzenia. W trzecim etapie limfocyty T intensywnie namnażają się w tkankach docelowych i powodują lizę komórek poprzez mechanizmy Fas/FasL i perforyna/granzym. Eliminacja komórek docelowych przez cytotoksyczne limfocyty T dawcy prowadzi do dalszego wzrostu produkcji

cytokin prozapalnych, takich jak wymienione w kroku pierwszym i zostaje zapoczątkowane błędne koło [32]. Etapy, w które szczególnie zaangażowana jest mikrobiota jelitowa, to niewątpliwie etapy pierwszy i drugi. Podczas pierwszej fazy przewód pokarmowy zostaje masywnie uszkodzony, a APC prezentują w drugiej fazie antygeny – zarówno te własne (epitopy jelitowe, skórne i wątrobowe powstałe w wyniku rozpadu komórek po radio/chemioterapii) lub obce - głównie jako antygeny drobnoustrojowe (np. fragmenty ściany komórkowej bakterii). Istnieje coraz więcej dowodów na to, że dysbioza mikrobioty jelitowej (nieprawidłowy skład jakościowy i ilościowy mikrobioty jelitowej, głównie bakterii jelitowych) działa jako czynnik ryzyka GvHD. W swoich wcześniejszych pracach naukowych wykazałem wraz z zespołem, że kolonizacja jelita bakteriami opornymi na antybiotyki (antibiotic-resistant bacteria, ARB) przed przeszczepieniem szpiku, będąca markerem dysbiozy jelitowej i utraty zjawiska „oporności na kolonizację”, jest czynnikiem ryzyka GvHD, głównie przewodu pokarmowego [33]. Jednocześnie, równolegle i po naszym doniesieniu inne grupy wykazały, że niska bioróżnorodność bakterii jelitowych koreluje z niższym całkowitym przeżyciem i większą częstością występowania GvHD [34,35]. Główną przyczyną mniejszej różnorodności bakteryjnej jest antybiotykoterapia przed i w trakcie alloHCT [36]. Wszystkie te fakty wiązały się z zaproponowaniem m. in. przeze mnie i nasz zespół naukowy (jako jedni z pierwszych na świecie) hipotezy, że mikrobiota jelitowa ma jeden z kluczowych udziałów w patogenezie i propagacji aGvHD (w tkance limfatycznej związanej z błoną śluzową, a zwłaszcza z jelitami (MALT i GALT) stacjonuje około 70% populacji wszystkich limfocytów człowieka i to w tych tkankach istnieje ciągła, niekończąca się „rozmowa” (cross-talk) między komórkami immunokompetentnymi i mikrobiomem).

Pierwsze eksperymenty oceniające rolę mikrobioty jelitowej w patogenezie aGvHD przeprowadzono w latach 70 XX-ego wieku. Kolejne badania wykazały, że wprowadzenie metronidazolu i/lub ciprofloksacyny do schematu kondycjonowania (lub innych strategii dekontaminacji przewodu pokarmowego) skutkowało mniejszą częstością występowania aGvHD [37,38]. Poza tym ostatnie badania w dobie sekwencjonowania nowej generacji wykazały, że utrata różnorodności bakteryjnej jest związana z rozwojem aGvHD przewodu pokarmowego [39–41]. Stwierdzono, że mechanizmem takiej indukcji aGvHD jest brak równowagi między różnicowaniem komórek Th17 i Treg z powodu utraty zróżnicowanej mikrobioty jelitowej [42].

Uszkodzenie nabłonka przez terapię kondycjonującą i napromieniowanie prowadzi do utraty integralności jelit, a następnie translokacji bakteryjnej. Ponadto sama aGvHD przyczynia się do dalszej dysbiozy poprzez uszkodzenie komórek Panetha, co ułatwia namnażanie się

potencjalnie szkodliwych bakterii [43,44]. Bakterie przenoszą wzorce molekularne związane z patogenami (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), które są odpowiedzialne za aktywację wrodzonego układu odpornościowego [45]. PAMPs są rozpoznawane przez kilka receptorów, takich jak receptory toll-podobne (TLR) [46], receptory podobne do NOD (NLR) [47] i Ig-podobne lektyny wiążące kwas sialowy [48]. Prowadzi to do dalszej aktywacji komórek T dawcy przez wrodzony układ odpornościowy i dodatkowo zaostrza aGvHD.

Wśród bakterii, które zapobiegają rozwojowi aGvHD, są Clostridiales, które są silnymi producentami krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (short-chain fatty acids, SCFA). Stwierdzono, że większa liczebność tych bakterii jest związana ze zmniejszoną liczbą zgonów związanych z GvHD [49,50]. Jenq i in. wykazali, że zwiększona obecność bakterii z rodzaju *Blautia* należących do Clostridiales była związana ze zmniejszoną liczbą zgonów związanych z GvHD. Ponadto liczebność tych samych bakterii pozytywnie korelowała z całkowitym przeżyciem. Czynniki wymienianymi przez autorów jako potencjalnie prowadzące do redukcji *Blautii* w jelicie było leczenie antybiotykami skierowanymi przeciwko bakteriom beztlenowym oraz stosowane przez długi czas całkowite żywienie pozajelitowe [41]. Inne badanie wykazało również, że stosowanie aztreonamu i cefepimu, które mają bardziej ochronny mechanizm działania na mikrobiotę beztlenową, powodowało zmniejszenie śmiertelności związanej z GvHD [39].

Z drugiej strony duża liczebność niektórych bakterii predysponuje do wystąpienia GvHD i zwiększonego nasilenia choroby. *Enterococcus* jest jednym z takich przykładów, a zwiększona liczba tych bakterii występuje na początku aGvHD [51]. Co ciekawe, głównym źródłem energii dla tych bakterii jest laktoza, dlatego pacjenci z zespołem złego wchłaniania laktozy, a co za tym idzie zwiększonym stężeniem laktozy w świetle jelita, mają zwiększone ryzyko dominacji *Enterococcus*. Co więcej, myszy model alloHCT na diecie pozbawionej laktozy wykazał mniejszą liczbę tych bakterii w mikrobiocie jelitowej, a tym samym lepszą przeżywalność związaną z GvHD [52]. Inną bakterią wyróżnioną jako predysponującą do GvHD jest *Akkermansia muciniphila*, która jest związana ze zwiększoną śmiertelnością aGvHD u myszy [53].

Co więcej, oprócz samych bakterii, ich metabolity mogą również wpływać na patogenezę aGvHD. Prawdopodobnie najbardziej znanym metabolitem bakterii jelitowych jest maślan, jeden z SCFA, który jest głównym źródłem energii dla IEC [54], a po alloHCT jego stężenie jest znacząco zmniejszone [55]. Wykazano, że maślan poprawia integralność jelit, hamuje apoptozę, co z kolei prowadzi do złagodzenia aGvHD [40]. Dodatkowo powoduje zwiększone różnicowanie naiwnych limfocytów T jelit w Treg, które znane są z wyciszania odpowiedzi

immunologicznej związanej z aGvHD [56,57]. Maślan jest także inhibitorem deacetylazy histonów, która hamuje limfocyty T dawcy stymulowane antygenem [58].

Niedawno przedstawione badania wyraźnie sugerują, że obfitość i bogactwo mikrobioty jelitowej w okresie wszczepienia neutrofilii ma kluczowe znaczenie w odniesieniu do przewidzenia ryzyka rozwoju aGvHD. Badacze wykazali, że pacjenci, u których różnorodność bakteryjna była obniżona z powodu kondycjonowania i przyjmowania antybiotyków mają zwiększone ryzyko aGvHD [59].

Powyższe obserwacje oraz nasze wnioski dotyczące przeszczepiania mikrobioty jelitowej (fecal microbiota transplantation, FMT) w celu dekolonizacji bakterii opornych na antybiotyki z przewodu pokarmowego pacjentów z nowotworami krwi i szpiku [60], w których potwierdziliśmy skuteczność tej procedury u pacjentów z obniżoną odpornością skutkowało włączeniem do badań także pacjentów z ostrą, sterydooporną postacią choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, których rokowanie, wobec braku skutecznych alternatywnych metod (do momentu ukazania się badania z ruxolitibnem), jak wskazano wyżej jest bardzo niepomyślne. Wobec danych naukowych, o konieczności obecności w mikrobiocie bogatego repertuaru mikroorganizmów, antygenów, w tym konkretnych szczepów a także obserwując konieczność oceny preparatów pod względem bezpieczeństwa (m. in. wobec udokumentowania przez nas przypadku rozwinięcia aGvHD po zarażeniu norowirusem pochodzącym z preparatu mikrobioty [61]) zdecydowano się przeprowadzić badania podstawowe, mające na celu ustalenie parametrów mikrobioty jelitowej, które najlepiej ją charakteryzują oraz porównać te parametry w zależności od metody wytwarzania preparatów mikrobioty jelitowej. Jednocześnie opracowano protokół FMT dla pacjentów z ciężką, jelitową postacią aGvHD oraz przeprowadzono analizy ich skuteczności wraz z analizą globalną.

### ***CEL NAUKOWY***

Głównym celem niniejszego cyklu, wchodzącego w skład rozprawy habilitacyjnej, jest:

- kompleksowe poszerzenie wiedzy w zakresie oceny parametrów mikrobioty jelitowej mających najbardziej informatywny charakter dla celów wytwarzania preparatów mikrobioty dla uzyskania optymalnych jakościowo i bezpiecznych preparatów do leczenia chorych wysokiego ryzyka, w szczególności aGvHD,
- ustalenie protokołu, wstępnego profilu bezpieczeństwa oraz skuteczności w pilotażowych i jednocześnie jednych z pierwszych na świecie procedurach FMT w celu leczenia ciężkiej, sterydoopornej postaci aGvHD,

- podsumowania dotychczasowych wyników wszystkich udokumentowanych procedur FMT w celu leczenia aGvHD za pomocą przeglądu systematycznego z metaanalizą.

## Bibliografia:

1. Greinix, H.T., D.J. Eikema, L. Koster, O. Penack, I. Yakoub-Agha, S. Montoto, C. Chabannon, J. Styczynski, A. Nagler, M. Robin, et al., *Improved outcome of patients with graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies over time: an EBMT mega-file study*. Haematologica, 2021.
2. Pasquini, M., Z. Wang, M.M. Horowitz, and R.P. Gale, 2013 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. Clin Transpl, 2013; p. 187-97.
3. Khoury, H.J., T. Wang, M.T. Hemmer, D. Couriel, A. Alousi, C. Cutler, M. Aljurf, J.H. Antin, M. Ayas, M. Battiwalla, et al., *Improved survival after acute graft-versus-host disease diagnosis in the modern era*. Haematologica, 2017. **102**(5): p. 958-966.
4. McDonald, G.B., How I treat acute graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract and the liver. Blood, 2016. **127**(12): p. 1544-50.
5. Kuykendall, T.D. and B.R. Smoller, Lack of specificity in skin biopsy specimens to assess for acute graft-versus-host disease in initial 3 weeks after bone-marrow transplantation. J Am Acad Dermatol, 2003. **49**(6): p. 1081-5.
6. Glucksberg, H., R. Storb, A. Fefer, C.D. Buckner, P.E. Neiman, R.A. Clift, K.G. Lerner, and E.D. Thomas, *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors*. Transplantation, 1974. **18**(4): p. 295-304.
7. Harris, A.C., R. Young, S. Devine, W.J. Hogan, F. Ayuk, U. Bunworasate, C. Chanswangphuwana, Y.A. Efebera, E. Holler, M. Litzow, et al., *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. **22**(1): p. 4-10.
8. Nash, R.A., M.S. Pepe, R. Storb, G. Longton, M. Pettinger, C. Anasetti, F.R. Appelbaum, R.A. Bowden, H.J. Deeg, K. Doney, et al., *Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate*. Blood, 1992. **80**(7): p. 1838-45.
9. Jagasia, M., M. Arora, M.E. Flowers, N.J. Chao, P.L. McCarthy, C.S. Cutler, A. Urbano-Ispizua, S.Z. Pavletic, M.D. Haagenson, M.J. Zhang, et al., *Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2012. **119**(1): p. 296-307.
10. Flowers, M.E., Y. Inamoto, P.A. Carpenter, S.J. Lee, H.P. Kiem, E.W. Petersdorf, S.E. Pereira, R.A. Nash, M. Mielcarek, M.L. Fero, et al., *Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria*. Blood, 2011. **117**(11): p. 3214-9.
11. Storb, R., H.J. Deeg, J. Whitehead, F. Appelbaum, P. Beatty, W. Bensinger, C.D. Buckner, R. Clift, K. Doney, V. Farewell, et al., *Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia*. N Engl J Med, 1986. **314**(12): p. 729-35.
12. Storb, R., J.H. Antin, and C. Cutler, Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease? Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(1 Suppl): p. S18-27.
13. Westin, J.R., R.M. Saliba, M. De Lima, A. Alousi, C. Hosing, M.H. Qazilbash, I.F. Khouri, E.J. Shpall, P. Anderlini, G. Rondon, et al., *Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes*. Adv Hematol, 2011. **2011**: p. 601953.
14. Martin, P.J., J.D. Rizzo, J.R. Wingard, K. Ballen, P.T. Curtin, C. Cutler, M.R. Litzow, Y. Nieto, B.N. Savani, J.R. Schriber, et al., *First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(8): p. 1150-63.
15. Xhaard, A., V. Rocha, B. Bueno, R.P. de Latour, J. Lenglet, A. Petropoulou, P. Rodriguez-Otero, P. Ribaud, R. Porcher, G. Socie, et al., *Steroid-refractory acute GVHD: lack of long-term improved survival using new generation anticytokine treatment*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(3): p. 406-13.
16. Zeiser, R., N. von Bubnoff, J. Butler, M. Mohty, D. Niederwieser, R. Or, J. Szer, E.M. Wagner, T. Zuckerman, B. Mahuzier, et al., *Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease*. N Engl J Med, 2020. **382**(19): p. 1800-1810.
17. Walker, I., T. Panzarella, S. Couban, F. Couture, G. Devins, M. Elemary, G. Gallagher, H. Kerr, J. Kuruvilla, S.J. Lee, et al., *Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(2): p. 164-173.
18. Luznik, L., P.V. O'Donnell, and E.J. Fuchs, Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. Semin Oncol, 2012. **39**(6): p. 683-93.
19. Busca, A., F. Locatelli, F. Marmont, C. Ceretto, and M. Falda, Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Am J Hematol, 2007. **82**(1): p. 45-52.
20. Ishiwata, K., A. Nishida, H. Ota, T. Ikebe, M. Tsuji, H. Yamamoto, Y. Asano-Mori, N. Uchida, K. Izutsu, and S. Taniguchi, Infliximab Treatment for Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease After Reduced-Intensity Cord Blood Transplantation in Adults. Blood, 2011. **118**(21): p. 4553-4553.
21. Zeiser, R. and B.R. Blazar, Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. N Engl J Med, 2017. **377**(22): p. 2167-2179.
22. Ferrara, J.L. and G. Yanik, Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. Clin Adv Hematol Oncol, 2005. **3**(5): p. 415-9, 428.
23. Shlomchik, W.D., M.S. Couzens, C.B. Tang, J. McNiff, M.E. Robert, J. Liu, M.J. Shlomchik, and S.G. Emerson, *Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells*. Science, 1999. **285**(5426): p. 412-5.
24. Hanash, A.M., J.A. Dudakov, G. Hua, M.H. O'Connor, L.F. Young, N.V. Singer, M.L. West, R.R. Jenq, A.M. Holland, L.W. Kappel, et al., *Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 339-50.
25. Ayabe, T., D.P. Satchell, C.L. Wilson, W.C. Parks, M.E. Selsted, and A.J. Ouellette, *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 113-8.
26. Eriguchi, Y., K. Nakamura, D. Hashimoto, S. Shimoda, N. Shimono, K. Akashi, T. Ayabe, and T. Teshima, *Decreased secretion of Paneth cell alpha-defensins in graft-versus-host disease*. Transpl Infect Dis, 2015. **17**(5): p. 702-6.
27. Pelaseyed, T., J.H. Bergstrom, J.K. Gustafsson, A. Ermund, G.M. Birchenough, A. Schutte, S. van der Post, F. Svensson, A.M. Rodriguez-Pineiro, E.E. Nyström, et al., *The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 8-20.
28. Penack, O., E. Holler, and M.R. van den Brink, Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. Blood, 2010. **115**(10): p. 1865-72.

29. Wysocki, C.A., A. Panoskaltis-Mortari, B.R. Blazar, and J.S. Serody, *Leukocyte migration and graft-versus-host disease*. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4191-9.
30. Koyama, M., R.D. Kuns, S.D. Olver, N.C. Raffelt, Y.A. Wilson, A.L. Don, K.E. Lineburg, M. Cheong, R.J. Robb, K.A. Markey, et al., *Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease*. *Nat Med*, 2011. **18**(1): p. 135-42.
31. Theobald, M., T. Nierle, D. Bunjes, R. Arnold, and H. Heimpel, *Host-specific interleukin-2-secreting donor T-cell precursors as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(23): p. 1613-7.
32. Zeiser, R. and B.R. Blazar, *Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(26): p. 2565-2579.
33. Bilinski, J., K. Robak, Z. Peric, H. Marchel, E. Karakulka-Prystupniak, K. Halaburda, P. Rusicka, E. Swoboda-Kopec, M. Wroblewska, W. Wiktor-Jedrzejczak, et al., *Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016. **22**(6): p. 1087-1093.
34. Peled, J.U., A.L.C. Gomes, S.M. Devlin, E.R. Littmann, Y. Taur, A.D. Sung, D. Weber, D. Hashimoto, A.E. Slingerland, J.B. Slingerland, et al., *Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(9): p. 822-834.
35. Weber, D., R.R. Jenq, J.U. Peled, Y. Taur, A. Hiergeist, J. Koestler, K. Dettmer, M. Weber, D. Wolff, J. Hahn, et al., *Microbiota Disruption Induced by Early Use of Broad-Spectrum Antibiotics Is an Independent Risk Factor of Outcome after Allogeneic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017. **23**(5): p. 845-852.
36. *Physicians Abstracts*. *Bone Marrow Transplantation*, 2016. **51**(1): p. S1-S102.
37. Beelen, D.W., A. Elmaagacli, K.D. Muller, H. Hirche, and U.W. Schaefer, *Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial*. *Blood*, 1999. **93**(10): p. 3267-75.
38. Guthery, S.L., J.E. Heubi, and A. Filipovich, *Enteral metronidazole for the prevention of graft versus host disease in pediatric marrow transplant recipients: results of a pilot study*. *Bone Marrow Transplant*, 2004. **33**(12): p. 1235-9.
39. Shono, Y., M.D. Docampo, J.U. Peled, S.M. Perobelli, E. Velardi, J.J. Tsai, A.E. Slingerland, O.M. Smith, L.F. Young, J. Gupta, 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**(339): p. 339ra71.
40. Mathewson, N.D., R. Jenq, A.V. Mathew, M. Koenigsnecht, A. Hanash, T. Toubai, K. Oravecz-Wilson, S.R. Wu, Y. Sun, C. Rossi, et al., *Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(5): p. 505-513.
41. Jenq, R.R., Y. Taur, S.M. Devlin, D.M. Ponce, J.D. Goldberg, K.F. Ahr, E.R. Littmann, L. Ling, A.C. Gobourne, L.C. Miller, et al., *Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015. **21**(8): p. 1373-83.
42. Han, L., H. Zhang, S. Chen, L. Zhou, Y. Li, K. Zhao, F. Huang, Z. Fan, L. Xuan, X. Zhang, et al., *Intestinal Microbiota Can Predict Acute Graft-versus-Host Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019. **25**(10): p. 1944-1955.
43. Eriguchi, Y., S. Takashima, H. Oka, S. Shimoji, K. Nakamura, H. Uryu, S. Shimoda, H. Iwasaki, N. Shimono, T. Ayabe, et al., *Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins*. *Blood*, 2012. **120**(1): p. 223-31.
44. Levine, J.E., E. Huber, S.T. Hammer, A.C. Harris, J.K. Greenson, T.M. Braun, J.L. Ferrara, and E. Holler, *Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality*. *Blood*, 2013. **122**(8): p. 1505-9.
45. Hill, G.R. and J.L. Ferrara, *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**(9): p. 2754-9.
46. Cook, D.N., D.S. Pisetsky, and D.A. Schwartz, *Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 975-9.
47. Shaw, M.H., T. Reimer, Y.G. Kim, and G. Nunez, *NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(4): p. 377-82.
48. Pillai, S., I.A. Netravali, A. Cariappa, and H. Mattoo, *Siglecs and immune regulation*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 357-92.
49. Lee, S.E., J.Y. Lim, D.B. Ryu, T.W. Kim, S.S. Park, Y.W. Jeon, J.H. Yoon, B.S. Cho, K.S. Eom, Y.J. Kim, et al., *Alteration of the Intestinal Microbiota by Broad-Spectrum Antibiotic Use Correlates with the Occurrence of Intestinal Graft-versus-Host Disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019. **25**(10): p. 1933-1943.
50. Payen, M., I. Nocolis, M. Robin, D. Michonneau, J. Delannoye, C. Mayeur, N. Kapel, B. Bercot, M.J. Butel, J. Le Goff, et al., *Functional and phylogenetic alterations in gut microbiome are linked to graft-versus-host disease severity*. *Blood Adv*, 2020. **4**(9): p. 1824-1832.
51. Holler, E., P. Butzhammer, K. Schmid, C. Hundsrucker, J. Koestler, K. Peter, W. Zhu, D. Sporrer, T. Hehlhans, M. Kreutz, 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**(5): p. 640-5.
52. Stein-Thoeringer, C.K., K.B. Nichols, A. Lazrak, M.D. Docampo, A.E. Slingerland, J.B. Slingerland, A.G. Clurman, G. Armijo, A.L.C. Gomes, Y. Shono, et al., *Lactose drives Enterococcus expansion to promote graft-versus-host disease*. *Science*, 2019. **366**(6469): p. 1143-1149.
53. Peled, J.U., S.M. Devlin, A. Staffas, M. Lumish, R. Khanin, E.R. Littmann, L. Ling, S. Kosuri, M. Maloy, J.B. Slingerland, et al., *Intestinal Microbiota and Relapse After Hematopoietic-Cell Transplantation*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(15): p. 1650-1659.
54. Canani, R.B., M.D. Costanzo, L. Leone, M. Pedata, R. Meli, and A. Calignano, *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(12): p. 1519-28.
55. Romick-Rosendale, L.E., D.B. Haslam, A. Lane, L. Denson, K. Lake, A. Wilkey, M. Watanabe, S. Bauer, B. Litts, N. Luebbing, et al., *Antibiotic Exposure and Reduced Short Chain Fatty Acid Production after Hematopoietic Stem Cell Transplant*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018. **24**(12): p. 2418-2424.
56. Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T.A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, et al., *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. *Nature*, 2013. **504**(7480): p. 446-50.
57. Edinger, M., F. Powrie, and R. Chakraverty, *Regulatory mechanisms in graft-versus-host responses*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(1 Suppl): p. 2-6.
58. Choi, S.W., E. Gatzka, G. Hou, Y. Sun, J. Whitfield, Y. Song, K. Oravecz-Wilson, I. Tawara, C.A. Dinarello, and P. Reddy, *Histone deacetylase inhibition regulates inflammation and enhances Tregs after allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans*. *Blood*, 2015. **125**(5): p. 815-9.
59. Han, L., Z. Fan, H. Jin, L. Xuan, M. Dai, F. Huang, R. Lin, J. Sun, and Q. Liu, *Intestinal Microbiota at Neutrophil Engraftment Can Predict Acute Graft-Versus-Host Disease in the Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Blood*, 2018. **132**: p. 2122.

60. 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**(3): p. 364-370.
61. Bilinski, J, Lis, K, Tomaszewska, A, Pechcinska, A, Grzesiowski, P, Dzieciatkowski, T, Walesiak, A, Gieriej, B, Ziarkiewicz-Wróblewska, B, Tyszka, M, et. al. Eosinophilic gastroenteritis and graft-versus-host disease induced by transmission of Norovirus with fecal microbiota transplant. *Transpl Infect Dis.* 2021; **23**(1): e13386.

### ***OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO (osiągniętych wyników)***

***Ad. 1. Bilinski J, Dziurzynski M, Grzesiowski P, Podsiadly E, Stelmaszczyk-Emmel A, Dzieciatkowski T, Dziewit L, Basak GW. Multimodal Approach to Assessment of Fecal Microbiota Donors based on Three Complementary Methods. J Clin Med. 2020; 9(7):2036. doi: 10.3390/jcm9072036. PMID: 32610522; PMCID: PMC7409046***

Pomimo rozkwitu badań z FMT, nasza wiedza na temat rzeczywistego składu „zdrowej mikrobioty” jest nadal niewielka. Nie wiemy dokładnie, w jaki sposób przeszczepione bakterie przeżywają, kolonizują i funkcjonują w jelitach biorcy ani, co najważniejsze, jakie metody mogą lub powinny być stosowane do diagnozowania i monitorowania przeszczepionej mikrobioty w celu oceny czy preparat mikrobioty jelitowej jest odpowiedni i składa się rzeczywiście ze „zdrowej mikrobioty” czy inne przyczyny wpłynęły np. na niewszczepienie się materiału. Analizy ludzkich mikroorganizmów jelitowych były do niedawna przeprowadzane głównie z wykorzystaniem metodologii hodowli klasycznych, ograniczając badaną różnorodność biologiczną tylko do gatunków poddających się hodowli, chociaż wiadomo, że tylko około 15–20% drobnoustrojów żyjących w jelitach ludzkich udało się kiedykolwiek wyhodować. Dostępność nowych narzędzi, głównie sekwencjonowania nowej generacji (NGS), umożliwiła ocenę taksonomicznych genów markerowych, a nawet całych genomów pobranych ze złożonych społeczności drobnoustrojów. Najszerzej stosowana metoda NGS do taksonomicznej i filogenetycznej oceny składu ekosystemu mikrobioty opiera się na analizie amplikonu PCR genu 16S rRNA.

Obecnie można zaobserwować dynamiczny rozwój rynku oferującego zawiesiny mikrobioty jelitowej oraz narzędzia do oceny mikrobioty. Firmy dostarczają materiał od różnych dawców, stosując różne metodologie badania dawców i przetwarzania kału. Jednak każda z tych metod jest zwykle stosowana oddzielnie i na podstawie tych odrębnych analiz buduje się daleko idące wnioski. Istnieje bardzo niewiele doniesień porównujących różne metody oceny mikrobioty jelitowej. Istnieje również potrzeba zidentyfikowania tak zwanych „super-dawców”, tj. osób, których mikrobiom zawiera wszystkie istotne drobnoustroje i potencjalnie może wyleczyć

zdecydowaną większość chorób i schorzeń związanych z mikrobiomem (jeżeli takie zjawisko rzeczywiście istnieje).

**Dlatego w niniejszym badaniu przeprowadziliśmy serię eksperymentów, stosując podejście łączenia metod analitycznych, aby prześledzić stabilność składu mikrobioty jelitowej u różnych dawców w czasie i znaleźć najbardziej odpowiednią metodę oceny jakości mikrobioty jelitowej dla prawidłowej selekcji dawców kału i utorowania drogi do znalezienia „super dawców”, w szczególności na potrzeby skomplikowanych patogenetycznie chorób, jak aGvHD.** Ponadto szukaliśmy bakteryjnych wskaźników „dobrych” i/lub „złych” dawców, aby uprościć i sparametryzować wybór odpowiednich dawców próbek kału dla FMT. **Postawiliśmy hipotezę, że różne metodologie oceny mikrobiomu do oceny dawców łącznie, dają więcej danych niż każda metoda z osobna.**

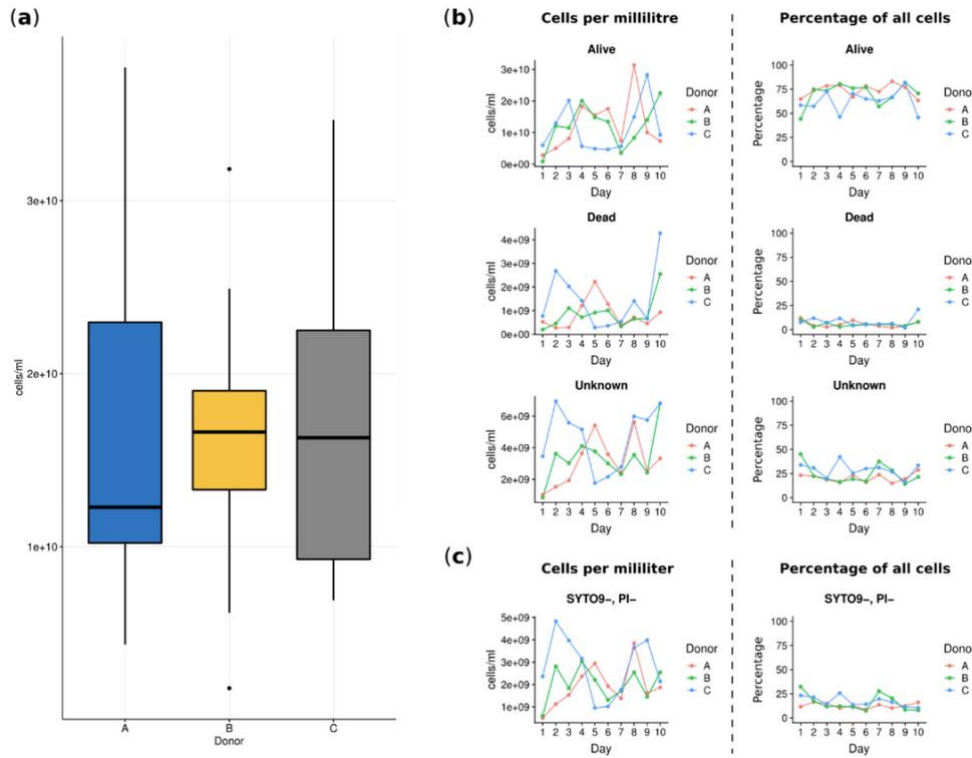
Do niniejszych eksperymentów wykorzystano dziesięć kolejnych stolców przekazanych przez każdego z trzech wyselekcjonowanych wcześniej dawców (łącznie 30 stolców). Dawcami kału byli losowo wybrani mężczyźni (dawcy A i B) oraz celowo wybrany mężczyzna (dawca C, czyli regularny dawca kału zarejestrowany w polskim banku kału). Zostali wybrani zgodnie z naszym protokołem opublikowanym wcześniej. Materiał (kał) od każdego dawcy z każdej donacji podzielono na trzy części – jedną do oceny metodą cytometrii przepływowej w metodzie LIVE/DEAD (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), drugą do wykonania hodowli klasycznych (tlenowych i beztlenowych) oraz trzecią do natychmiastowej izolacji DNA oraz sekwencjonowania regionu zmiennego V3-V4 16S rDNA (łącznie 90 próbek). Co ważne – cały eksperyment był wykonywany w warunkach aerobowych, tak jak w większości banków kału na świecie (dopiero w następnych etapach badaliśmy metodykę anaerobową, którą ostatecznie zaaplikowano w *spin-off* WUM Human Biome Institute – opis szczegółowy w dalszej części autoreferatu, w rozdziale osiągnięć organizacyjnych i innych).

Analiza metodą cytometrii przepływowej w metodzie LIVE/DEAD umożliwiła ocenę całkowitej liczby komórek w każdej próbce, jak również żywych i martwych komórek. Analiza ta posłużyła do odpowiedzi na pytanie, czy liczba komórek bakteryjnych jest istotna w ocenie mikrobioty kałowej i czy może służyć jako estymator „dobrego” lub „złego” dawcy. Przeprowadzona analiza wykazała, że prowadząc eksperyment w warunkach tlenowych, nie było statystycznie istotnych różnic między liczbą komórek w zawiesinach mikrobioty jelitowej przygotowanych z kału dawców (Rycina 1). Średnia liczba komórek we wszystkich próbkach była równa  $1,664 \times 10^{10}$  komórek/ml ( $\pm 0,913 \times 10^{10}$  komórek/ml). Jak pokazano na Rycinie 1 (prawa kolumna), odsetki wszystkich frakcji komórek, tj. żywych, martwych, nieznanych (nie wybarwionych jednym z odczynników) i SYTO9-PI- (podgrupa „nieznana”, niewybarwionych



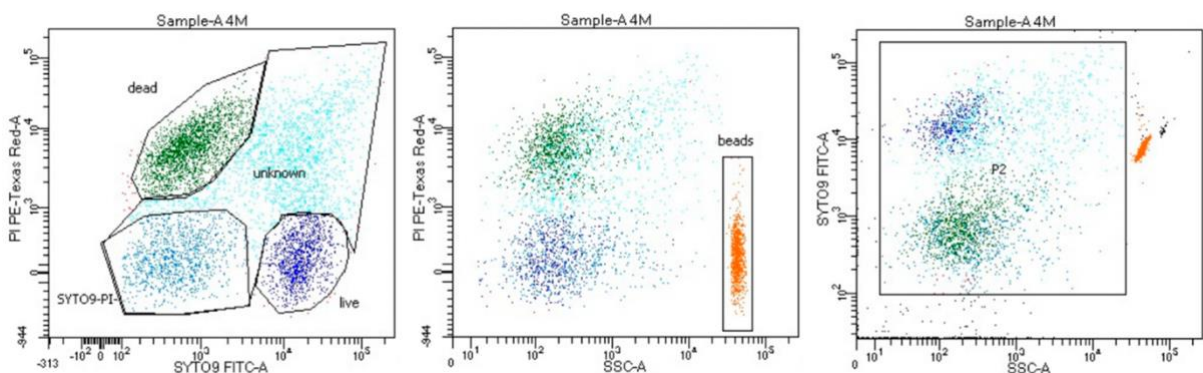
oboma odczynników uznanych za „podwójnie ujemne”) wykazywały stosunkowo stabilne liczby w każdej próbce kału na dzień i na dawcę. Zaobserwowano zauważalną dominację żywych komórek.

**Rycina 1.**



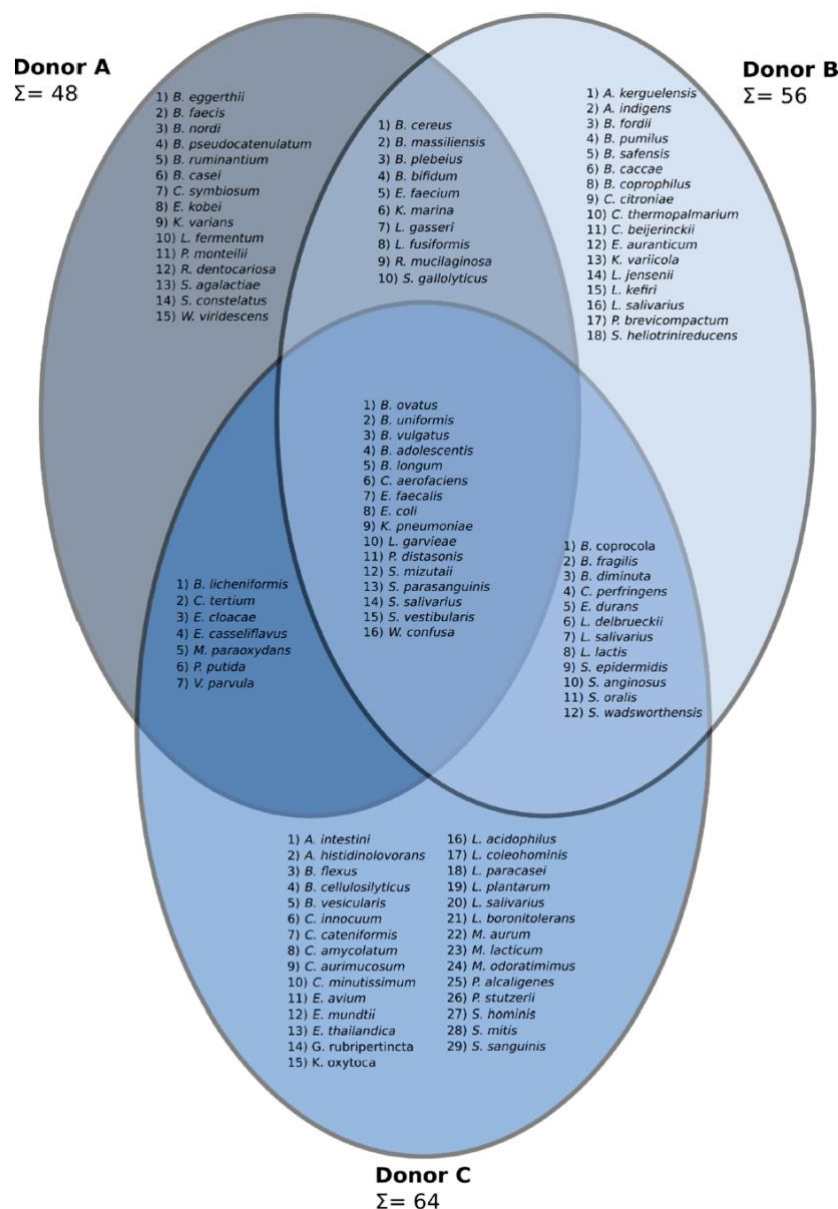
Co więcej, jak można wywnioskować powyżej ustalono, że **oprócz komórek żywych i martwych** występuje w populacji mikrobioty  **dodatkowa frakcja komórek** niebarwiąca się jednym, a przede wszystkim oboma odczynnikami (SYTO9 oraz jodkiem propidyny), **co według nas i taką postawiliśmy hipotezę**, w przypadku dwuujemnej populacji komórek, **stanowią spory bakteryjne** (Rycina 2; obrysowana frakcja komórek ciemnoniebieskich oznaczonych jako SYTO9-PI-).

**Rycina 2.**



Jako druga metoda oceny mikrobioty - przeprowadzono złożony eksperyment z zastosowaniem hodowli klasycznych (tlenowych i beztlenowych na różnorodnych podłożach), aby ocenić, czy ta technika może ujawnić możliwe do hodowli wskaźniki bakteryjne dla „dobrych” i „złych” dawców kału. W sumie stwierdzono 104 gatunki reprezentujące 36 rodzajów. Podsumowany skład gatunkowy bakterii dla każdego dawcy jest uwidoczniony na Rycinie 3. **Przedstawienie danych w postaci diagramu Venna umożliwiło wskazanie gatunków bakterii charakterystycznych dla każdego dawcy, gatunków wspólnych dla dwóch dawców i wreszcie gatunków, które tworzyły „mikrobiotę rdzeniową” i występowały u wszystkich analizowanych dawców.**

Rycina 3.



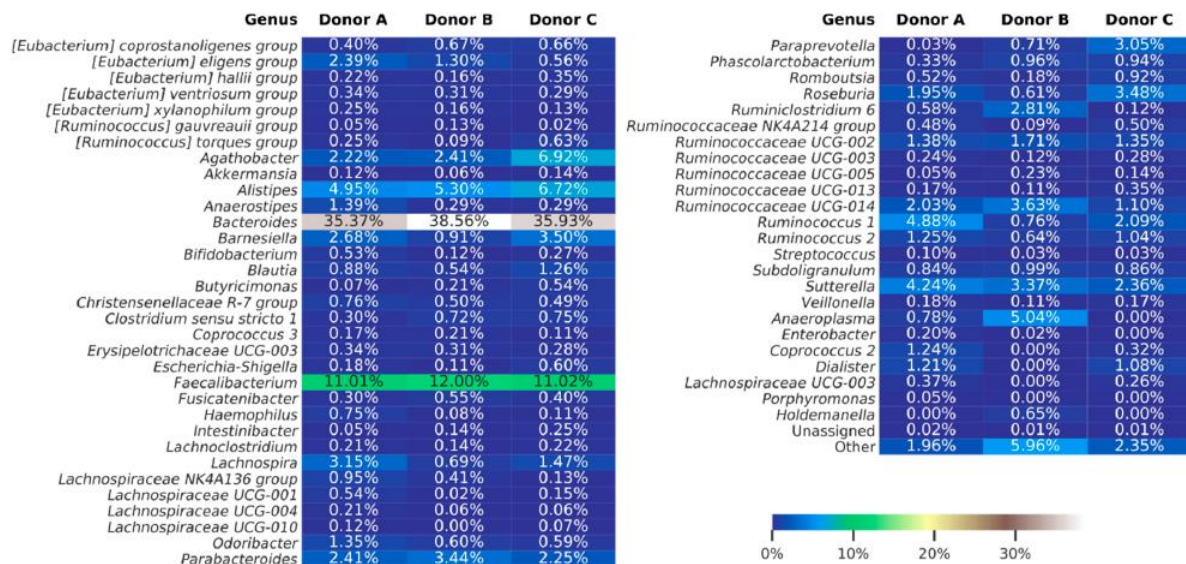


Wykazano, że najbardziej trwałym gatunkiem była *Escherichia coli*, którą wykryto we wszystkich próbkach. W większości próbek wykryto również inne gatunki, takie jak *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Enterococcus faecium* i *Streptococcus salivarius*, jednak ich trwałość różniła się znacznie między dawcami (Ryc. 4).

Zauważalne jest, że mnogość gatunków bakterii występowała tylko w poszczególnych dniach. Może to być konsekwencją błędu systematycznego tej metody lub prostej jednorazowej zmiany w zależności od spożywanego pokarmu. **Dlatego też, stosując hodowle konwencjonalne jako strategię ewaluacyjną do oceny jakości próbek kału, ważne jest powtarzanie pobierania próbek od poszczególnych dawców przez kilka dni. Pojedyncze pobieranie próbek może dostarczyć niereprezentatywnych i prawdopodobnie fałszywych wyników.**

W trzeciej porównywanej metodzie – NGS i sekwencjonowaniu regionów V3-V4 16S rDNA bakteryjnego wykazaliśmy, że na poziomie rodzaju najbardziej dominującymi taksonami były *Bacteroides* i *Faecalibacterium*, ze względną liczebnością w każdej próbce odpowiednio nie mniej niż 35% i 11% (Rycina 5).

**Rycina 5.**

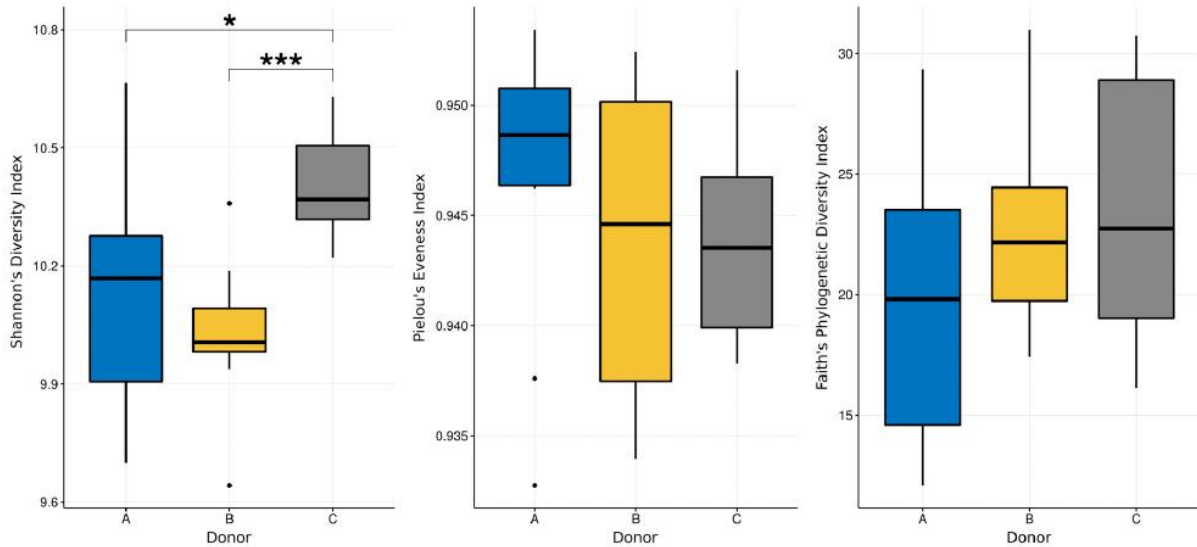


Dla wszystkich próbek obliczono wskaźnik różnorodności Shannona wraz ze wskaźnikiem Pielou, a do określenia, czy występują między nimi jakiegokolwiek różnice statystyczne, zastosowano test Kruskala-Wallisa. Wskaźnik Shannona był podobny dla dawców A i B, ze średnimi wartościami równymi 10,11 i 10,02, podczas gdy dla dawcy C był nieco, ale istotnie



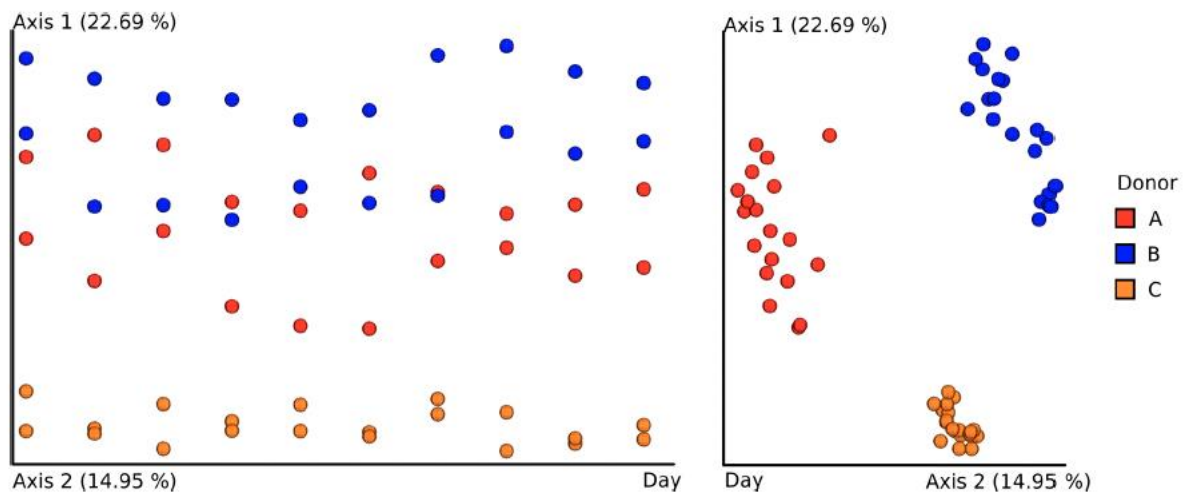
wyższy – 10,39 ( $p = 0,0191$  dla dawcy A w porównaniu z C i  $p = 0,0005$  dla dawcy B w porównaniu z C według testu Kruskala-Wallisa, wartość  $H = 12,18$ ; Rycina 6).

**Rycina 6.**



Biorąc pod uwagę, że powyższy test statystyczny dla znaczących różnic dał dwie pary, dawca A kontra C i dawca B kontra C, pary te poddano analizie ANCOM. W pierwszym przypadku analiza ANCOM wykazała, że dwa rodzaje Gram-ujemnych, bezwzględnych beztlenowców są liczniejsze w próbkach od dawcy C; były to *Acidaminococcus* i *Paraprevotella*. Ta sama analiza wykazała, że rzędy *Anaeroplasmatales* i *Gastranaerophilales* są bardziej obfite w próbkach od dawcy A. Analiza ANCOM drugiej pary (dawca B kontra C) wykazała, że *Anaeroplasma* jest bardziej obfita u dawcy B, wraz z rodzajami *Holdermanella* i dwiema niezbyt dobrze opisanymi rodzinami bakterii - *Muribaculaceae* i *Puniceicoccaceae*, członkami odpowiednio Bacteroidetes i Verrucomicrobia. Jeśli chodzi o taksony bardziej obfite w mikroflorę dawcy C, wykryto dwóch członków typu Firmucutes: *Lachnospiraceae* i *Dialister*. Podobnie jak w przypadku klasycznych eksperymentów z hodowlą, oceniono stabilność mikroflory jelitowej w czasie. Chociaż nie wykryto żadnych statystycznie istotnych różnic, analiza głównych współrzędnych (PCoA) na wskaźniku odmienności Bray-Curtisa pokazuje, że ogólne podobieństwo wewnętrzne próbek w czasie od dawcy C było znacznie wyższe niż w przypadku innych dawców. **Grupowanie składu bakteryjnego kału u dawcy C wskazuje na najbardziej stabilny skład mikroflory jelitowej w czasie (Rycina 7).**

**Rycina 7.**



Każda z metod opisanych w tym badaniu ma swoje zalety i wady. Klasyczne hodowle są stosunkowo tanie i powszechnie dostępne, ale wykazano, że metody na nich oparte mogą wykryć tylko do 20% wszystkich taksonów bakterii obecnych w danej próbce (a w ogóle w mikrobiocie całego globu hodowlami uzyskano jedynie około 1% bakterii). Metody oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji są bardziej precyzyjne, niezależne od etapu hodowli i mogą bardziej szczegółowo opisać każdą społeczność bakteryjną. Jednak są one również znacznie droższe, pracochłonne, mogą wprowadzać błędy i nie rozróżniają żywych i martwych mikroorganizmów. Aby rozwiązać ten problem, można zastosować takie metody, jak cytometria przepływowa ze znakowaniem fluorochromami (FCM), ponieważ umożliwiają one rozróżnienie żywych i martwych bakterii. Na podstawie tego badania i analizy literatury jasne jest, że nie ma uniwersalnej metody oceny mikrobioty jelitowej człowieka, a zwłaszcza, że niektóre metody, takie jak FCM, mogą dawać tylko ograniczone wyniki. Jednak w połączeniu metody przedstawione w tym badaniu mogą wygenerować szczegółowy obraz przekroju jakościowego i ilościowego mikrobioty jelitowej dla potrzeb prowadzenia FMT.

W tym badaniu wykazaliśmy, że posiewy kału charakteryzują się bardzo dużą zmiennością. Tworząc diagram Venna, zidentyfikowano „podstawową, rdzeniową mikrobiotę poddającą się hodowli”, która składała się tylko z 16 gatunków. Najwięcej gatunków, głównie beztlenowych, uzyskano od dawcy C, który był regularnym dawcą kału dla banku kału na cele wytwarzania FMT. Dawca C charakteryzował się istotnie statystycznie wyższą zawartością gatunków uznawanych za korzystne (*Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Blautia*, *Roseburia*, *Butyricimonas*). Ogólna bioróżnorodność mikrobiomu kału dawcy C była statystycznie istotnie wyższa niż od dawców A i B. Stabilność mikrobiomu w czasie była również większa dla dawcy C. W ocenie żywotności komórek bakteryjnych wyróżniono trzy grupy komórek: żywe, martwe

i nieznane. Populacja „nieznanych” komórek zawierała grupę komórek podwójnie ujemnych (SYTO9-, PI-), które według nas mogą być sporami bakteryjnymi lub ewentualnie bakteriami o bardzo grubej i niepoddającej się łatwej destrukcji ścianie komórkowej. Obecność podwójnie ujemnej populacji komórek korelowała ze względną ilością *Anaeroplasma*, bakterii (o grubej ścianie, tworzącej także spory) które pojawiają się częściej w mikroflorze jelitowej „nie-dawców” (dawców nienadających się do FMT) – **może to być markerem nieprawidłowej mikrobioty. Jednocześnie wykazano, że screening na dawcę mikrobioty jelitowej ma kolosalne znaczenie biorąc pod uwagę parametry mikrobioty oceniane powyższymi metodami. Każda z tych obserwacji powinna być brana pod uwagę w procesie przygotowywania preparatów dla biorców podwyższonego ryzyka, jak pacjenci z aGvHD** (i wyniki te wykorzystano przy tworzeniu banku Human Biome Institute – opis niżej).

**Ad. 2. Bilinski J, Dziurzynski M, Grzesiowski P, Podsiadly E, Stelmaszczyk-Emmel A, Dzieciatkowski T, Lis K, Tyszka M, Ozieranski K, Dziewit Ł, Basak GW. Fresh Versus Frozen Stool for Fecal Microbiota Transplantation-Assessment by Multimethod Approach Combining Culturing, Flow Cytometry, and Next-Generation Sequencing. Front Microbiol. 2022; 13:872735.**

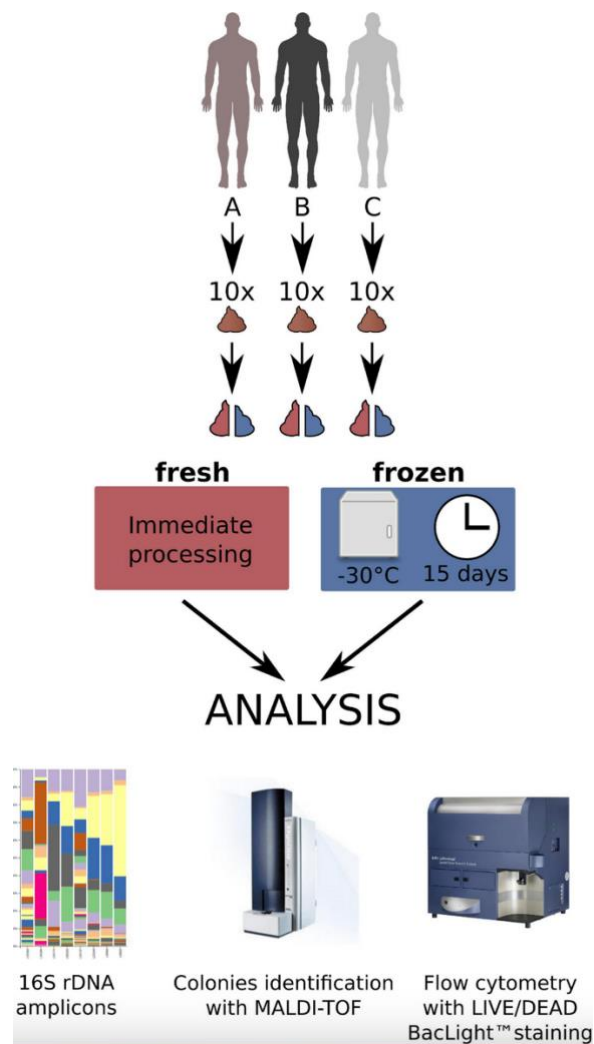
W kolejnej pracy, będącej dalszym etapem rozwijania metodologii produkcji FMT szczególnie do celów leczenia pacjentów wysokiego ryzyka, zastosowaliśmy wyżej opisane metody do kolektywnej analizy dwóch rodzajów preparatyki kału – świeżej i po mrożeniu bez dodatku krioprezerwantów przed przetworzeniem. Mrożenie samego kału, bez dodawania krioprotektantów, jest najczęstszą praktyką przy pobieraniu próbek od pacjentów, ale według wiedzy autorów jest również praktykowane przy przechowywaniu kału do produkcji preparatów mikrobioty kałowej do podawania biorcy, nie tylko historycznie (Gustafsson i in., 1999), ale także z bardzo dobrymi wynikami, nie odbiegającymi od innych obecnie (Grzesiowski i in., 2015). Dodawanie krioprotektantów, według niektórych autorów może zmieniać parametry mikrobioty jelitowej, jednak samo zamrażanie w temperaturze -20/-30°C całej próbki kału przed przygotowaniem preparatu nie zostało dotychczas opisane, chociaż opisy takiego zamrażania mogą sugerować, że pobranie i zamrożenie całego kału może być bardzo skuteczne (Vandeputte i in., 2017) i być może bardziej „naturalne”, co ma szczególne znaczenie dla pacjentów ze skomplikowanymi, szczególnie na podłożu immunologicznym, chorobami, jak aGvHD. Celem pracy było porównanie jakości preparatów FMT otrzymanych ze świeżego kału z preparatami otrzymanymi z kałów zamrożonych w temperaturze -30°C bez

kriokonserwacji i obróbki przed zamrożeniem. Hipoteza badawcza zakładała, że taki protokół konserwacji (zamrożenie całego stolca, następnie rozmrożenie i przetworzenie) jest równie skuteczny jak klasyczny świeży preparat FMT. Do przetestowania tej hipotezy zastosowano trzy uzupełniające się metody, opisane i zwalidowane wcześniej, w tym: (i) hodowlę w warunkach tlenowych i beztlenowych, (ii) pomiar żywotności metodą cytometrii przepływowej oraz (iii) sekwencjonowanie nowej generacji (metody opisane i zwalidowane przez nas w publikacji powyżej). Postulowaliśmy, że kał sam w sobie ma właściwości ochronne dla bakterii, a jego obróbka przed zamrożeniem nie jest obowiązkowa, ponieważ warunki beztlenowe panujące w kale i niska zawartość substancji uwodnionej mogą być naturalnym kriokonserwantem.

Do eksperymentów w niniejszej pracy wykorzystano dziesięć kolejnych stolców oddanych przez każdego z trzech (scharakteryzowanych w pracy wyżej) dawców (w sumie 30 stolców podzielonych na dwie równe części w celu przygotowania 60 zawiesin mikrobioty jelitowej, 30 ze świeżego i 30 z zamrożonego kału). Każdą próbkę kału po oddaniu i przewiezieniu do laboratorium podzielono na dwie równe części. Połowę każdego kału przetwarzano natychmiast, a drugą połowę przechowywano w stanie zamrożonym, bez żadnej obróbki, w temperaturze  $-30^{\circ}\text{C}$  przez średnio 15 dni, a następnie rozmrażano i przetwarzano w taki sam sposób, jak świeżą próbkę kału. Wszystkie próbki przygotowano w jednakowym czasie i w ten sam sposób w warunkach tlenowych poprzez homogenizację, rozcieńczenie w 0,9% NaCl i przesianie przez sterylną gazę lub sita w celu uzyskania klarownego, jednorodnego płynu będącego zawiesiną kału. Tak przygotowany materiał zarówno ze świeżego, jak i mrożonego kału podzielono następnie na trzy części – jedną do oceny metodą cytometrii przepływowej w metodzie LIVE/DEAD (Molecular Probes, Oregon, Stany Zjednoczone), drugą do wykonania hodowli klasycznej oraz trzecią do natychmiastowej izolacji DNA do sekwencjonowania regionów zmiennych V3-V4 16S rDNA (łącznie 60 próbek). Rycina 1 przedstawia protokół badawczy, którego użyliśmy w tej pracy.



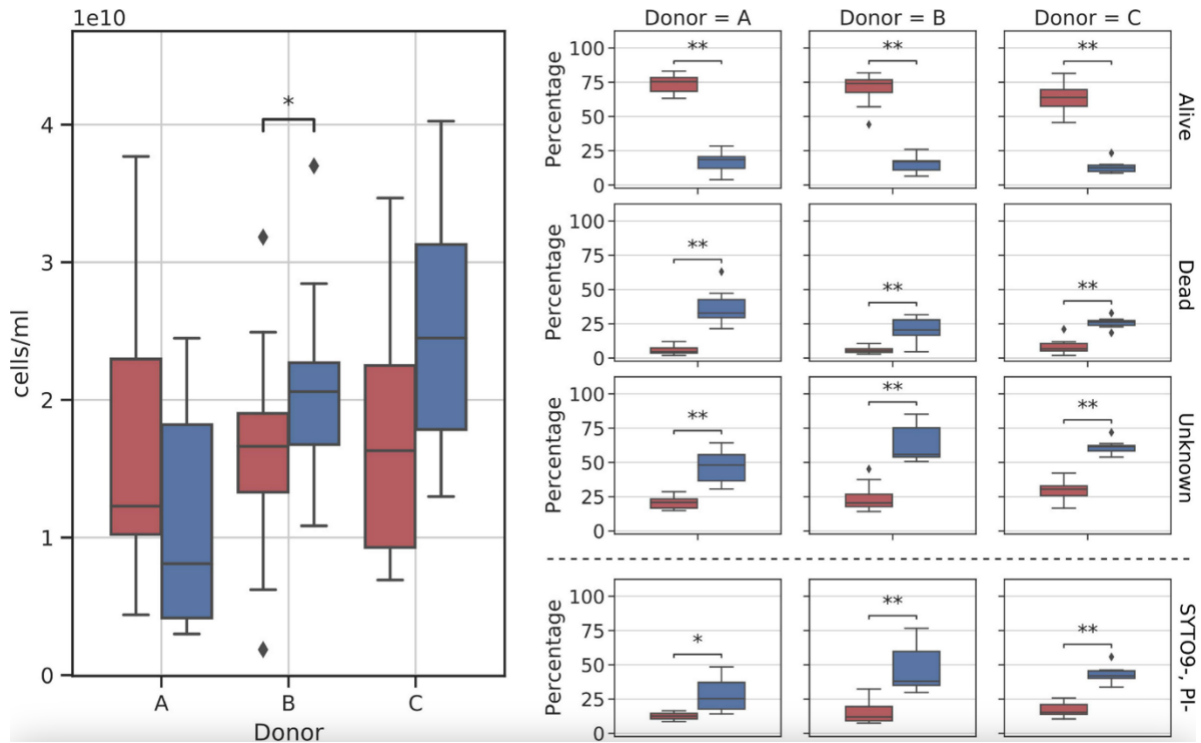
Rycina 1.



W analizie za pomocą cytometrii przepływowej w metodzie LIVE/DEAD w każdej z opisanych już wcześniej grup (komórek żywych, martwych, nieznanych, w tym podwójnie ujemnych ocenianych przez nas jako spory bakteryjne lub bakterie o wybitnie grubej ścianie komórkowej) wykryto wyraźną zmianę liczby komórek w wyniku zamrożenia całego stolca i następnie rozmrożenia i procesowania do wytworzenia zawiesiny mikrobioty jelitowej w warunkach aerobowych (Ryc. 1 – czerwone słupki – mikrobiota świeża, niebieskie mikrobiota mrożona). **Zamrażanie i rozmrażanie całego kału w celu przygotowania zawiesiny mikrobioty jelitowej spowodowało prawie 4-krotne zmniejszenie liczby żywych komórek w próbkach od wszystkich dawców.** Średnio 68,88% (SD = 10,85%) komórek w każdej świeżej próbce zostało sklasyfikowanych jako żywe, podczas gdy komórki żywe stanowiły tylko 15,08% (SD = 6,08%) wszystkich komórek w próbkach zamrożonych. **Odsetek martwych komórek wzrósł średnio czterokrotnie (świeże: 6,51%, mrożone: 27,45%), podczas gdy nieznaną grupę wzrosła dwukrotnie (świeża: 24,60%, mrożona: 57,47%).** Podgrupa SYTO9-PI-

odnotowała 2,5-krotny wzrost (świeże: 15,16%, mrożone: 39,20%). Wszystkie zmiany pomiędzy grupami świeżymi i mrożonymi były istotne statystycznie.

**Rycina 2.**

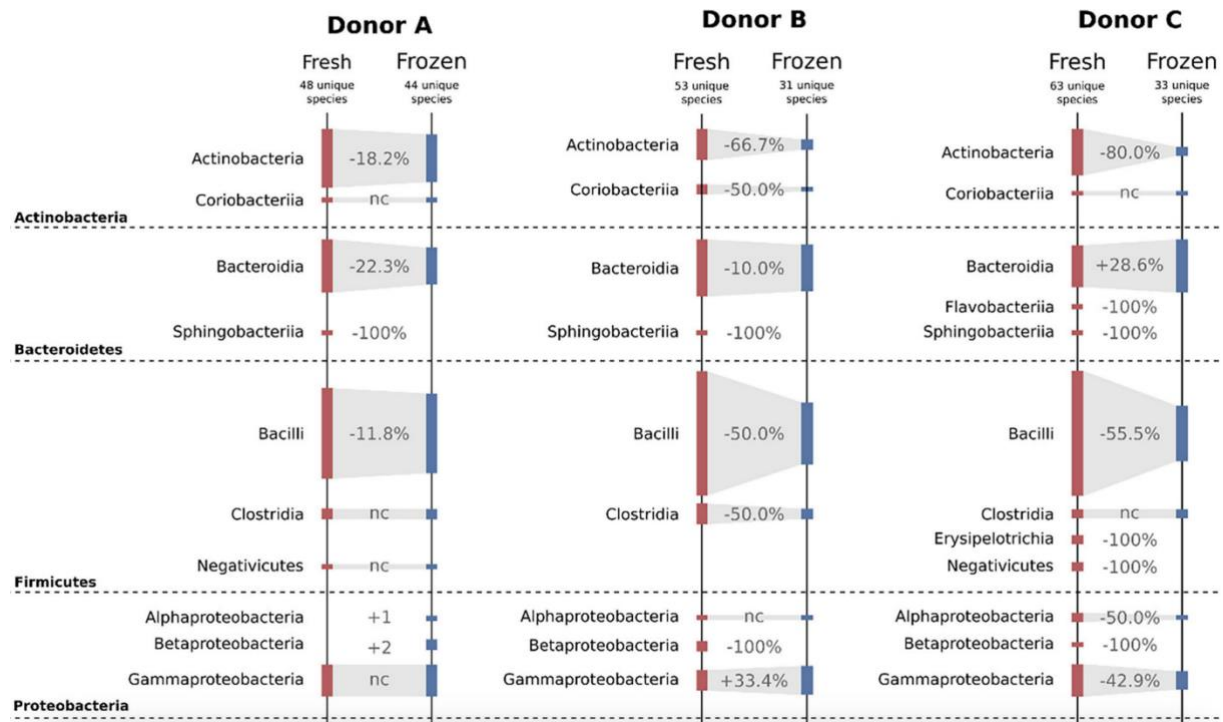


Próbki od dawcy C wydawały się reagować bardziej przewidywalnie na zamrażanie niż próbki od pozostałych dwóch dawców. Można to wytłumaczyć bardziej stabilnym składem mikrobioty dawcy C, jak udowodniono wcześniej.

Eksperymenty prowadzone na świeżych próbkach pozwoliły wyhodować 103 gatunki bakterii, podczas gdy po zamrożeniu i rozmrożeniu całego kału te same próbki dostarczyły tylko 69 gatunków; 47 z tych 69 gatunków wykryto również w świeżych próbkach, podczas gdy 22 były unikalne dla próbek zamrożonych. Dawca C charakteryzował się największym spadkiem liczby gatunków możliwych do wyhodowania - z 63 do 33, następnie dawca B, z 53 do 31, i dawca A, z 48 do 44 (Ryc. 2). Należy zauważyć, że tylko 31 ze 103 wykrytych gatunków bakterii znaleziono w zawiesinach przygotowanych z tego samego kału przed i po zamrożeniu. To dodatkowo potwierdza nasz wniosek z poprzedniej pracy, że chociaż metoda MALDI-TOF jest bardzo precyzyjna, wymaga powtarzalnego pobierania próbek w kolejnych następujących po sobie wypróżnieniach podczas badania różnych społeczności bakteryjnych. Co ciekawe, mrożone próbki wykazały większą liczbę „wysoc trwałych” gatunków, czyli gatunków wykrytych we wszystkich próbkach od tego samego dawcy. We wszystkich próbkach świeżych

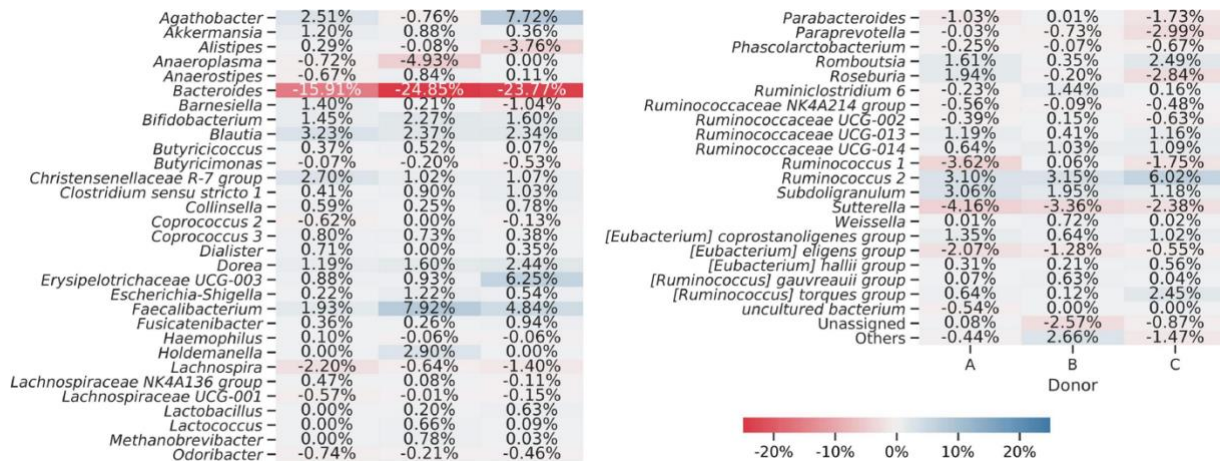
wykryto tylko *Escherichia coli*, podczas gdy w próbkach zamrożonych wykryto *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Escherichia coli*, *Lactococcus garvieae* i *Weissella confusa*.

Rycina 3.



Sekwencjonowanie NGS uzyskane ze świeżych i mrożonych próbek zostało przeprowadzone przy użyciu tej samej metodologii. Rycina 4 przedstawia różnice we względnych gęstościach bakterii między świeżymi i mrożonymi próbkami na poziomie taksonomicznym rodzaju. Głównym źródłem różnic między badanymi grupami był rodzaj *Bacteroides*. Zaobserwowaliśmy, że bakterie *Bacteroides* były bardziej obfite w świeżych niż mrożonych próbkach średnio o 21,51 punktu procentowego. Członkowie klasy *Clostridiales*, która okazała się charakterystyczna dla mrożonych próbek, byli znacznie bardziej rozproszeni. Największy udział w tym trendzie miały *Faecalibacterium* (więcej w próbkach mrożonych o 4,89 punktu procentowego), grupa *Ruminococcus 2* (więcej w próbkach mrożonych o 4,09 punktu procentowego) i *Agathobacter* (więcej w próbkach zamrożonych o 3,16 punktu procentowego).

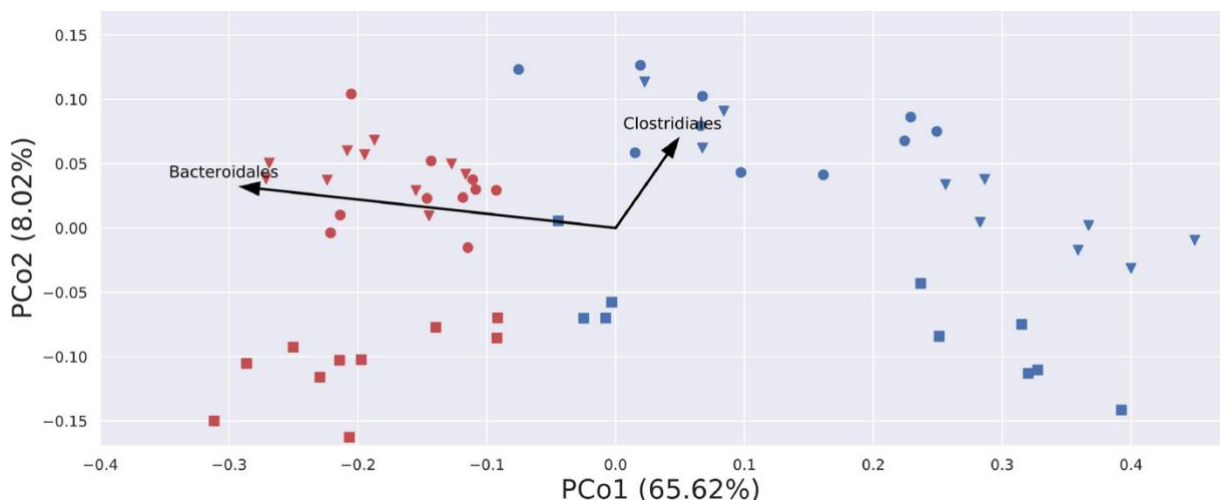
## Rycina 4.



Analiza bioróżnorodności alfa wykazała, że w większości przypadków wybrane wskaźniki różnorodności biologicznej były nieco niższe dla próbek mrożonych, ale nie wykryto istotnych statystycznie różnic przy porównywaniu próbek świeżych i mrożonych od tego samego dawcy. Nie stwierdzono również istotnych różnic w porównaniach wybranych wskaźników bioróżnorodności pomiędzy wszystkimi próbkami świeżymi i wszystkimi próbkami mrożonymi.

Analizy różnorodności beta z wykorzystaniem wizualizacji PCoA na wskaźniku Bray-Curtisa (ilościowym i jakościowym) oraz wskaźniku Jaccarda (tylko jakościowy) wykazały wyraźne klastry, ze świeżymi i mrożonymi próbkami skupionymi wokół dawców. Pokazuje to, że chociaż mrożenie wprowadziło pewne istotne różnice w składzie mikrobioty, różnice te były silniejsze dla par świeży/mrożony niż poszczególnych dawców (Ryc. 5). Ten podział można częściowo przypisać zmianom we względnej obfitości rzędów *Bacteroidales* i *Clostridiales*.

## Rycina 5.



Wykazano kilka korelacji między wynikami NGS a wynikami cytometrii przepływowej, dla zawiesin przygotowanych zarówno ze świeżego, jak i mrożonego kału. Nasze wyniki pokazują, że najwięcej korelacji można zaobserwować dla próbek dawcy B i podfrakcji cytometrii przepływowej SYTO9-, PI-. Rodzaj *Anaeroplasma* tak jak w poprzedniej pracy, dla próbek świeżych był dodatnio skorelowany (korelacja = 0,9377) z podfrakcją SYTO9-, PI-, a *Holdemanella* był skorelowany ujemnie (korelacja = -0,6982) z tą samą podfrakcją w świeżych próbkach dawcy B.

**Podsumowując, Nasze wyniki wyraźnie pokazują, że zamrażanie całego kału bez żadnego buforu kriokonserwującego znacząco zmienia profil mikrobioty jelitowej. Zmianę tę można wykryć przede wszystkim za pomocą połączenia zastosowanych przez nas metod, a najbardziej dzięki cytometrii przepływowej i hodowlom klasycznym.**

Cytometria przepływowa z barwieniem komórek wykazała, że zamrażanie powoduje istotne zmiany we wszystkich obserwowanych frakcjach. **Liczba żywych komórek spadła czterokrotnie, z około 70% do 15%, podczas gdy pozostałe dwie frakcje, martwe i nieznane, liczba komórek wzrosła czterokrotnie i podwoiła się, przy czym frakcja nieznana stała się dominująca, ze średnim udziałem 57,47% na próbkę.** Zmiany te zaobserwowano u wszystkich trzech dawców i nie wykryliśmy między nimi żadnych istotnych różnic. Należy jednak zauważyć, że gdybyśmy zastosowali cytometrię przepływową bez barwienia komórek (rozdzielanie komórek martwych i żywych), nie zaobserwowalibyśmy różnic między próbkami świeżymi i mrożonymi. Ta obserwacja dodatkowo podkreśla fakt, że tutaj wyniki NGS mogą być znacznie mylące, ponieważ opierają się głównie na DNA z martwych komórek, a zatem różnice w rzeczywistym żywym, aktywnym składzie mikrobioty mogą być znacznie większe i widoczne dopiero jeśli zastosowano sortowanie komórek dla frakcji żywej i martwej przed izolacją DNA. **Ma to kolosalne znaczenie dla wnioskowania jak przygotowywać preparaty do FMT, szczególnie dla pacjentów z innymi niż zakażenia *C. difficile* chorobami, szczególnie GvHD. Nasze analizy wskazały, że aby podać pacjentom z GvHD preparaty najlepsze jakościowo należy wybrać preparat świeży lub mrożony z dodatkiem kriokonserwantów (przedmiot osobnej pracy naukowej, będącej aktualnie w fazie przygotowania manuskryptu). Dodatkowo, aby pacjenci mogli być leczeni preparatami bezpiecznymi, bardzo dokładny screening dawców oraz wytwarzanie w warunkach beztlenowych są warunkiem koniecznym do spełnienia (dane w trakcie opracowywania w Human Biome Institute).**

**Ad. 3. Bilinski J, Lis K, Tomaszewska A, Grzesiowski P, Dzieciatkowski T, Tyszka M, Karakulska-Prystupiuik E, Boguradzki P, Tormanowska M, Halaburda K, Waszczuk-Gajda A, Wiktor-Jedrzejczak W, Basak GW. 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(3):E88-E91.**

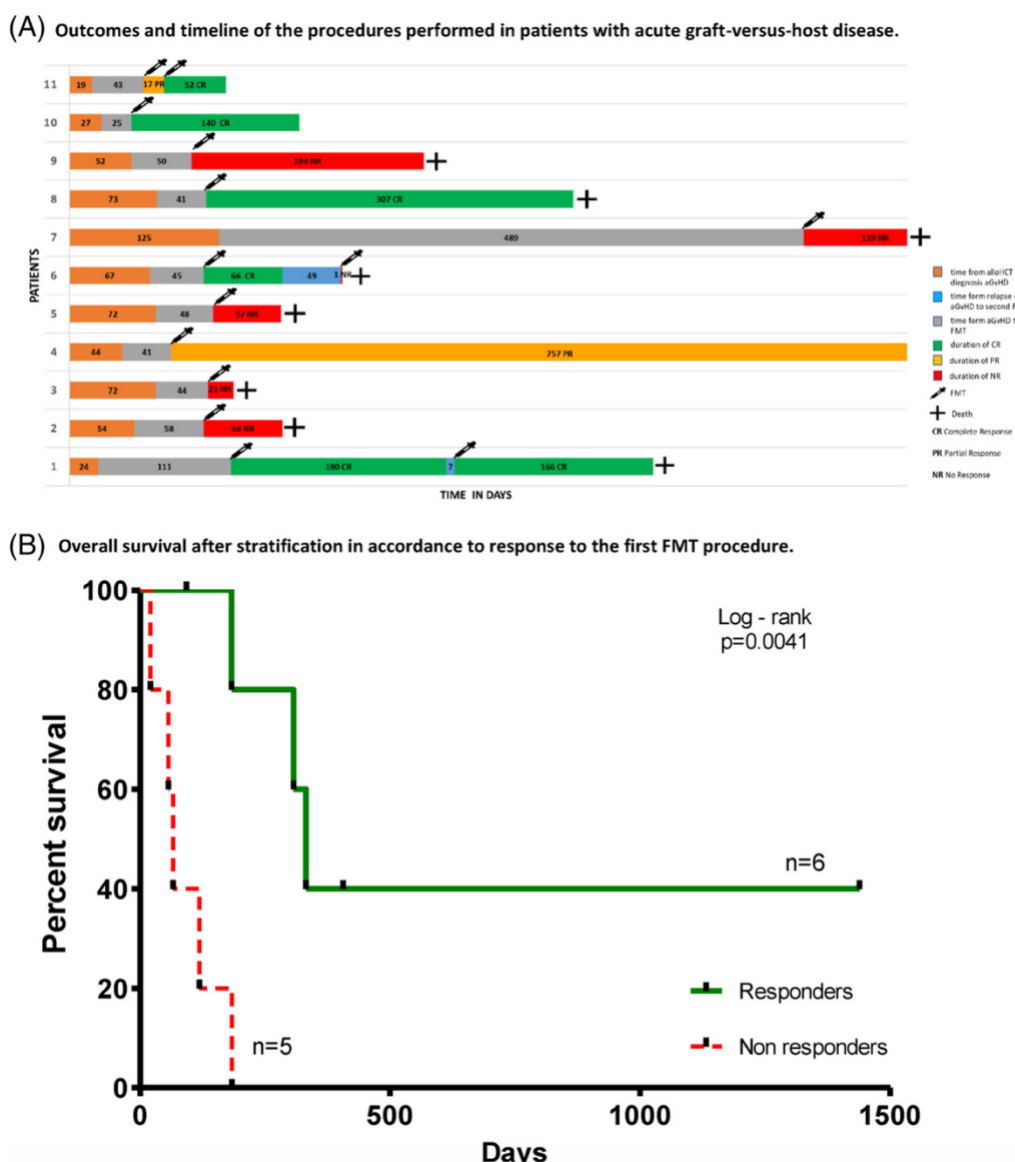
Mając doświadczenie w stosowaniu FMT u pacjentów z nowotworami hematologicznymi, skolonizowanymi bakteriami opornymi na antybiotyki (ARB) i ze względu na to, że pacjenci z GvHD jelit są często skolonizowani ARB oraz mają bardzo złe rokowanie w przypadku sterydooporności, w trakcie eksperymentu badawczego STOP ARB (clinicaltrials.gov - NCT02461199) postanowiliśmy włączać do niego także pacjentów z ostrą (a) lub przewlekłą (c) GvHD skolonizowanych ARB, aby w odrębnej (niniejszej) pracy podsumować wyniki wpływu FMT na przebieg aGVHD. **Na moment publikacji była to jedna z dwóch najliczniej opublikowanych kohort opisujących pacjentów leczonych FMT z powodu aGVHD i, dodatkowo, o ile nam wiadomo, pierwszy raport na temat FMT w cGVHD.**

Łącznie wykonano **16 FMT u 11 pacjentów z aGVHD** (FMT powtórzone u 3 pacjentów) i u 2 pacjentów z cGVHD (łącznie 13 pacjentów), w wieku 23–66 lat, chorujących na różne nowotwory hematologiczne, otrzymujących standardową profilaktykę immunosupresyjną cyklosporyną i metotreksatem (w schematach mieloablacyjnych) lub mykofenolanem mofetylu (w schematach o zmniejszonej intensywności kondycjonowania) z ATG lub bez (w zależności od rodzaju dawcy i źródła komórek). Mediana czasu od alloHCT do rozpoznania aGVHD wyniosła 54 dni (zakres 19–125). Wszyscy z wyjątkiem jednego pacjenta z aGVHD byli oporni na steroidy i mieli zajęcie przewodu pokarmowego (mediana stopnia: 3); dodatkowo osiem miało objawy skórne (mediana stopnia: 3), a pięć miało objawy zajęcia wątroby (mediana stopnia: 1) w procesie aGVHD. Mediana czasu od rozpoznania aGVHD do pierwszego leczenia FMT wyniosła 45 dni (25–489 dni). Większość pacjentów nadal przyjmowała steroidy podczas FMT (mediana dawki 0,5 mg metyloprednizolonu/kg masy ciała). Wszyscy pacjenci byli skolonizowani ARB (od 1 do 3 ARB na pacjenta). Trzech pacjentów poddano drugiemu FMT, dwóm z powodu nawrotu aGVHD i jednemu w celu pogłębienia odpowiedzi (pacjent uzyskał częściową odpowiedź po pierwszym FMT).

W 11 z 14 (71%; dwie procedury FMT zostały wyłączone z analizy z powodu przedwczesnej śmierci i braku osiągnięcia przez pacjentów pierwszego punktu kontrolnego) nastąpiła dekolonizacja dekolonizacja co najmniej jednej ARB. **Ogólny wskaźnik odpowiedzi (ORR) u pacjentów z aGVHD osiągnął 57% (8/14 FMT), w tym całkowita remisja (CR) wystąpiła**

po wykonaniu 42% (6/14) FMT (Rycina 1A). Mediana czasu trwania odpowiedzi do wystąpienia nawrotu choroby, zgonu lub do ostatniej wizyty kontrolnej wyniosła 153 dni (17–757). Pacjentom z częściową remisją (PR) zaproponowano drugi zabieg; jeden z nich zgodził się i osiągnął CR, drugi odmówił i pozostał w PR przez 757 dni, aż do chirurgicznego usunięcia zajętej długości jelita cienkiego, co zakończyło się CR. Co ciekawe, spośród trzech pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na leczenie ruksolitynibem (P7, P8, P11), czyli lekiem, który w 2020 roku uzyskał pozytywne wyniki w badaniu klinicznym w leczeniu sterydoopornej a GvHD (Zeiser R, N Engl J Med 2020; 382:1800-1810), dwóch uzyskało CR po FMT (P8, P11). **Wszyscy pacjenci oporni na leczenie FMT zmarli w ciągu 200 dni po zabiegu, a mediana przeżycia całkowitego (OS) wyniosła 66 dni. U pacjentów z odpowiedzią na leczenie FMT mediana OS wyniosła 332 dni (HR 0,18 95% CI 0,03–0,93,  $p < 0,005$ ; ryc. 1B).**

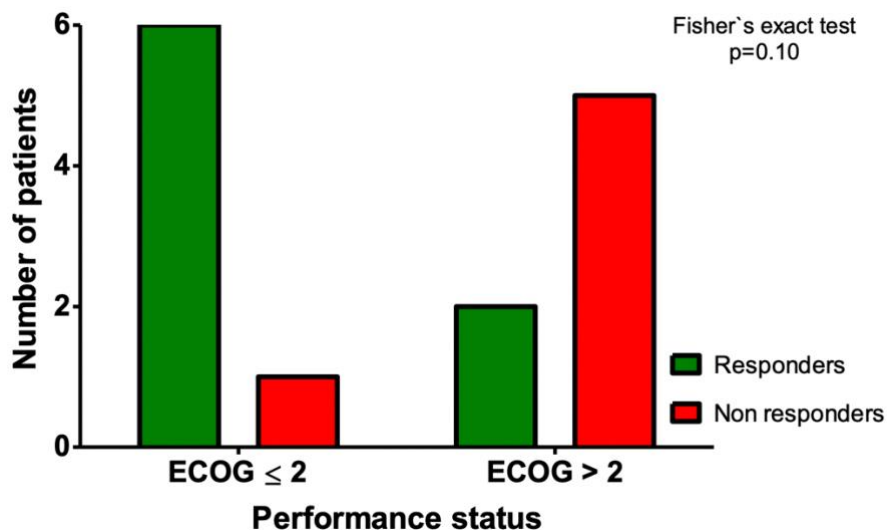
Rycina 1.





Większość pacjentów, u których wystąpiła odpowiedź na FMT (6/8; 75%), przeszła zabieg FMT w lepszym stanie ogólnym (ECOG  $\leq 2$ ; Rycina 2).

Rycina 2.



Ciężkie zdarzenia niepożądane (SAE) rozpoznano u 8 (56%) pacjentów (stopień 3–5; Tabela 1). Dwa SAE były wczesnymi zgonami w ciągu 7 dni od FMT. Większość SAE i AE sklasyfikowano jako niezwiązane z FMT (nieδροżność jelit, zapalenie okrężnicy, zapalenie oskrzeli i płuc, płatowe zapalenie płuc i jeden wstrząs septyczny); jednakże jeden epizod wstrząsu septycznego, jeden epizod sepsy i jeden przypadek zakażenia przewodu pokarmowego wywołanego przez Norowirusa (przypadek opublikowany w *Transplant Inf Dis*) były prawdopodobnie (jeden wstrząs septyczny i jeden posocznica) lub na pewno (zakażenie Norowirusem) związane z wykonywanym FMT. Sepsa i wstrząs septyczny uważane za związane z FMT były spowodowane przez szeroko wrażliwe patogeny (*E. coli*). Oba przypadki rozwinęły się <6 godzin po zabiegu. Żadne z tych zdarzeń nie zakończyło się śmiercią. **Ponownie zaobserwowaliśmy trend, zgodnie z którym większość powikłań występowała u pacjentów z późną decyzją o leczeniu FMT i w gorszym stanie ogólnym (ECOG >2), ale różnica między grupami nie była istotna statystycznie (ECOG  $\leq 2$ ; 33% vs. 83%, RR = 0,44; 95% CI 0,17– 1.13).** Uważamy, że FMT w leczeniu aGvHD jelitowego powinno być wykonywane na wcześniejszych etapach. Przypadki te pokazały nam, że pacjenci z GvHD wymagają ścisłego monitorowania po zabiegu i bardzo dobrego nadzoru przez personel. Jednocześnie wnioskowaliśmy, iż należy zdecydowanie lepiej i bardziej szczegółowo prowadzić screening dawców mikrobioty jelitowej, aby preparaty były najwyższej jakości i



bezpieczeństwa (podjęto decyzję, aby powołać Human Biome Institute - opis w dalszej części autoreferatu).

Ad. 4. *Biliński J, Jasiński M, Tomaszewska A, Lis K, Kacprzyk P, Chmielewska L, Karakulska-Prystupiuk E, Mullish BH, Basak GW. Fecal microbiota transplantation with ruxolitinib as a treatment modality for steroid-refractory/dependent acute, gastrointestinal graft-versus-host disease: A case series. Am J Hematol. 2021; 96(12):E461-E463. doi: 10.1002/ajh.26365.*

**W kolejnej pracy zdecydowano się wprowadzić modyfikacje do pierwotnego protokołu FMT u pacjentów z aGvHD (w szczególności postacią jelitową) i przygotować schemat leczenia pacjentów z aGvHD, szczególnie postacią jelitową pod planowane badanie kliniczne.** W związku z wynikami badania randomizowanego z ruxolitinibem (Zeiser R, N Engl J Med 2020; 382:1800-1810) i prawdopodobnym umieszczeniem ruxolitinibu w najbliższych wytycznych (zarówno europejskich jak i amerykańskich) dotyczących leczenia sterydoopornej postaci aGvHD, a także biorąc pod uwagę możliwe komplementarne mechanizmy działania ruxolitynibu i FMT, przeszliśmy od pozytywnych wstępnych obserwacji klinicznych (w publikacji powyżej opisano pierwszych pacjentów, którzy otrzymali obie formy terapii), do zaoferowania terapii skojarzonej ruxolitynibem i FMT pacjentom ze sterydooporną/sterydozależną postacią jelitową aGvHD. Według naszej wiedzy było to pierwsze doniesienie na temat takiej terapii skojarzonej.

Ruxolitynib jest doustnym selektywnym inhibitorem JAK1 i JAK2. Kinaza janusowa (JAK) oraz przekaźniki sygnału i aktywatory szlaków sygnałowych transkrypcji (STAT) odgrywają ważną rolę w aktywacji komórek odpornościowych i zapaleniu tkanek podczas ostrej GvHD, w tym komórek dendrytycznych i granulocytów obojętnochłonnych. Uszkodzenie tkanek związane z ostrą GvHD, jest napędzane przez cytokiny zapalne, w których działaniu pośredniczą częściowo kinazy JAK. Już w badaniach przedklinicznych i badaniach klinicznych wczesnych faz z zastosowaniem ruxolitinibu do leczenia aGvHD okazało się, że zmniejsza on częstość występowania i nasilenie GvHD in vivo, jednocześnie zachowując mechanizm „przeszczep przeciwko białaczce”. Mając tę wiedzę postanowiliśmy połączyć oba mechanizmy działania immunomodulującego – po pierwsze ruxolitinibu, a po drugie plejotropowego oddziaływania antygenowego na układ odpornościowy mikrobioty jelitowej i przeprowadziliśmy pilotażowe badanie, łącząc obie formy terapii. Opisaliliśmy serię przypadków (Tabela 1), w której każdy pacjent w związku ze stwierdzeniem sterydoopornej

lub sterydozależnej jelitowej postaci aGvHD w stopniu ciężkim otrzymał ruxolitiniib oraz transplantację mikrobioity jelitowej.

**Tabela 1.**

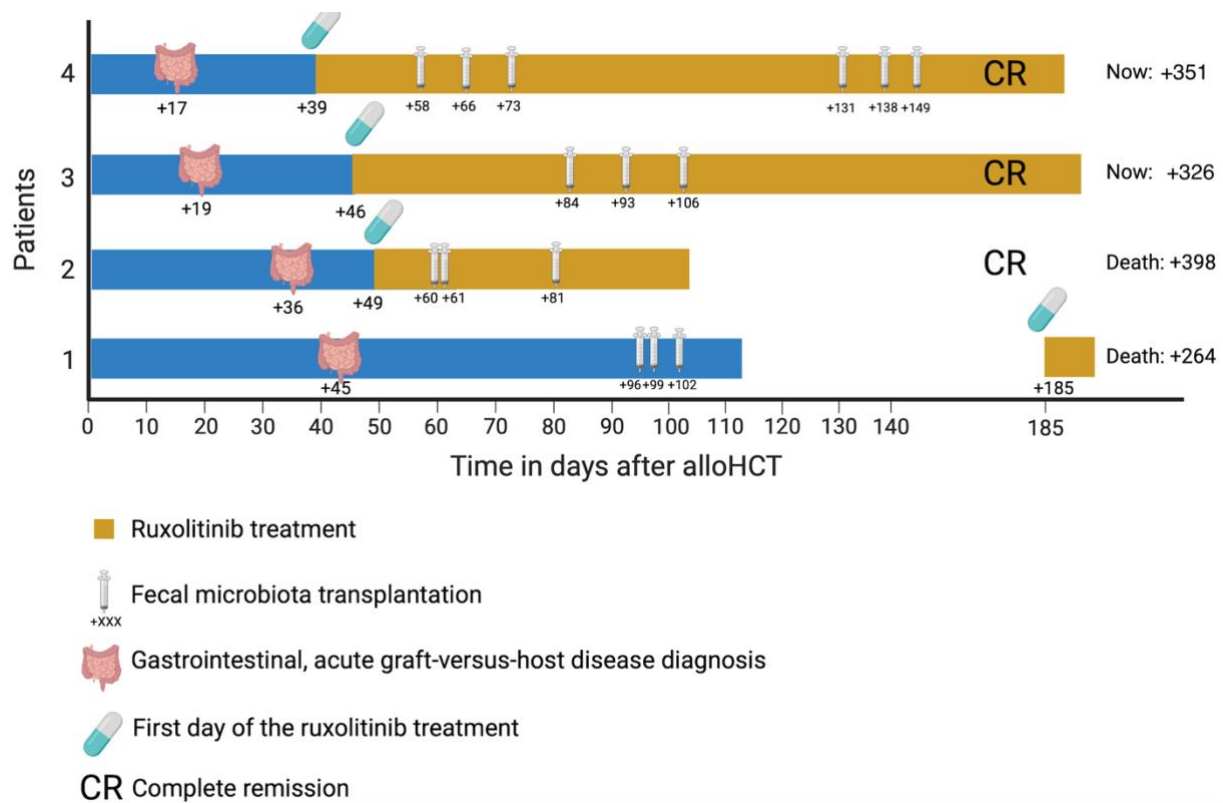
TABLE 1 Summary of treatment course and results in patients treated with ruxolitiniib and fecal microbiota transplantation (FMT)

Case no.	Underlying disease and type of alloHCT	Conditioning regimen	Antibiotic-resistant organisms colonizing the gut before alloHCT	Time from alloHCT to diagnosis of aGVHD	Severity of GI-aGVHD (max. Grade according to MAGIC)	Prophylaxis and treatment of aGVHD before ruxolitiniib and FMT (summary)	Day after alloHCT when steroid refractoriness/dependency was diagnosed	Ruxolitiniib (day of first dose after alloHCT)	FMT (days after alloHCT)	Response to therapy of ruxolitiniib + FMT
1	AML, MUD	FLU TBI: Total body irradiation (200 cGy) and Fludarabine 30 mg/m <sup>2</sup> (5 days); RIC	<i>P. aeruginosa</i> MBL	+45	IV	Anti-Thymocyte Globulin Methotrexate, cyclosporine A, budesonide, methylprednisolone, mycophenolate mofetil, tacrolimus	+73	+185	96, 99, 102	Very short response after FMT, stabilization after ruxolitiniib adding for approx. 100 days. Formally NR
2	ALL, MRD	FLU MEL: Fludarabine 30 mg/m <sup>2</sup> (5 days), Melphalan 70 mg/m <sup>2</sup> (2 days); RIC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MBL, <i>K. pneumoniae</i> ESBL, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MBL, <i>Enterobacter asburiae</i> ESBL, <i>Candida glabrata</i> , <i>C. crusei</i>	+36	IV	Methotrexate, cyclosporine A, budesonide, methylprednisolone, mycophenolate mofetil, tacrolimus, photopheresis	+53	+49	60, 61, 81	CR gut and PR skin
3	ALL, MRD	FLU MEL: Fludarabine 30 mg/m <sup>2</sup> (5 days), Melphalan 70 mg/m <sup>2</sup> (2 days); RIC	<i>E. coli</i> ESBL, <i>K. pneumoniae</i> ESBL, <i>C. difficile</i>	+19	IV	Methotrexate, cyclosporine A, budesonide, Methylprednisolone, tacrolimus	+29	+46	84, 93, 106	CR
4	AML, MUD	FLU Bu4: Fludarabine 30 mg/m <sup>2</sup> (5 days), Busulphan 3.2 mg/kg (4 days); MAC	<i>K. pneumoniae</i> ESBL	+17	IV	Anti-Thymocyte Globulin, Methotrexate, cyclosporine A, budesonide, methylprednisolone, tacrolimus	+42	+39	58, 66, 73 131, 138, 149	CR

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; alloHCT, allogeneic hematopoietic cell transplantation; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; FMT, fecal microbiota transplantation; GI-aGVHD, gastrointestinal, acute graft-versus-host disease; MAC, myeloablative conditioning; MRD, matched related donor; MUD, matched unrelated donor; PR, partial remission; RIC, reduced intensity conditioning.

**Wypracowaliśmy protokół, w którym po włączeniu ruxolitiniibu w małej dawce pacjent otrzymuje „sesje FMT”, czyli łącznie do 6 podań mikrobioity jelitowej, dążąc do uzyskania całkowitej remisji.** Dodatkowo, dwóch ostatnich pacjentów, u których odpowiedź była najbardziej wyrazista i spektakularna otrzymało preparaty wytwarzane wg nowego protokołu, całkowicie w warunkach beztlenowych, w technologii produkcyjnej opracowanej w *spin-off* WUM Human Biome Institute, z bardzo restrykcyjnym skринingiem dawców mikrobioity jelitowej, aby uzyskać maksymalne bezpieczeństwo i jakość preparatów mikrobioity jelitowej. **Łącznie 3 z 4 (75%) opisanych pacjentów uzyskało całkowite remisje (CR; Rycina 1)** i pilotaż ten wskazał na konieczność prowadzenia dalszych badań, w tym badań o najwyższej dowodowości (randomizowanych, kontrolowanych placebo) aby potwierdzić bądź zweryfikować wyniki naszego pilotażu, iż połączenie ruxolitiniibu z sesjami FMT (w szczególności preparatów bogatych w beztlenowce od dawców poddawanych restrykcyjnemu skринingowi) może być bardzo skuteczne, skuteczniejsze od obu form leczenia osobno.

Rycina 1.



Po tym pilotażowym doświadczeniu widzimy ogromny potencjał w opisanej strategii (łączenia ruxolitinibu i FMT w sesjach, jako podwójnej immunomodulacji) i sugerujemy przeprowadzenie, oraz dążymy do przeprowadzenia, randomizowanego badania klinicznego, aby znaleźć odpowiedź i zbadać, czy i jak głęboko FMT poprawia wyniki leczenia pacjentów z aGvHD. **Widzimy realną szansę, iż efekt addytywny FMT w stosunku do ruxolitinibu pozwoli nie tylko zmniejszyć stosowaną dawkę ruxolitinibu, niwelując jego działania niepożądane, ale globalnie leczenie takie może uzyskać dużo lepsze wyniki końcowe.** Pierwsze badanie kliniczne, zostało zarejestrowane w bazie badań klinicznych [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT04269850).

Ad. 5. *Qiao X, Biliński J [współ-pierwszy autor i autor korespondencyjny], Wang L, Yang T, Luo R, Fu Y, Yang G. Safety and efficacy of fecal microbiota transplantation in the treatment of graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant. 2023 Jan;58(1):10-19.*

Po opublikowaniu przez nas i inne zespoły innych badań czy opisów przypadków z zastosowaniem transplantacji mikrobioty jelitowej w leczeniu aGvHD i w związku z bardzo zachęcającymi wyniki tych doniesień postanowiliśmy, w ramach współpracy międzynarodowej

o wykonaniu przeglądu systematycznego i metaanalizy, którego celem była ocena skuteczności i bezpieczeństwa FMT w leczeniu GVHD po alloHCT.

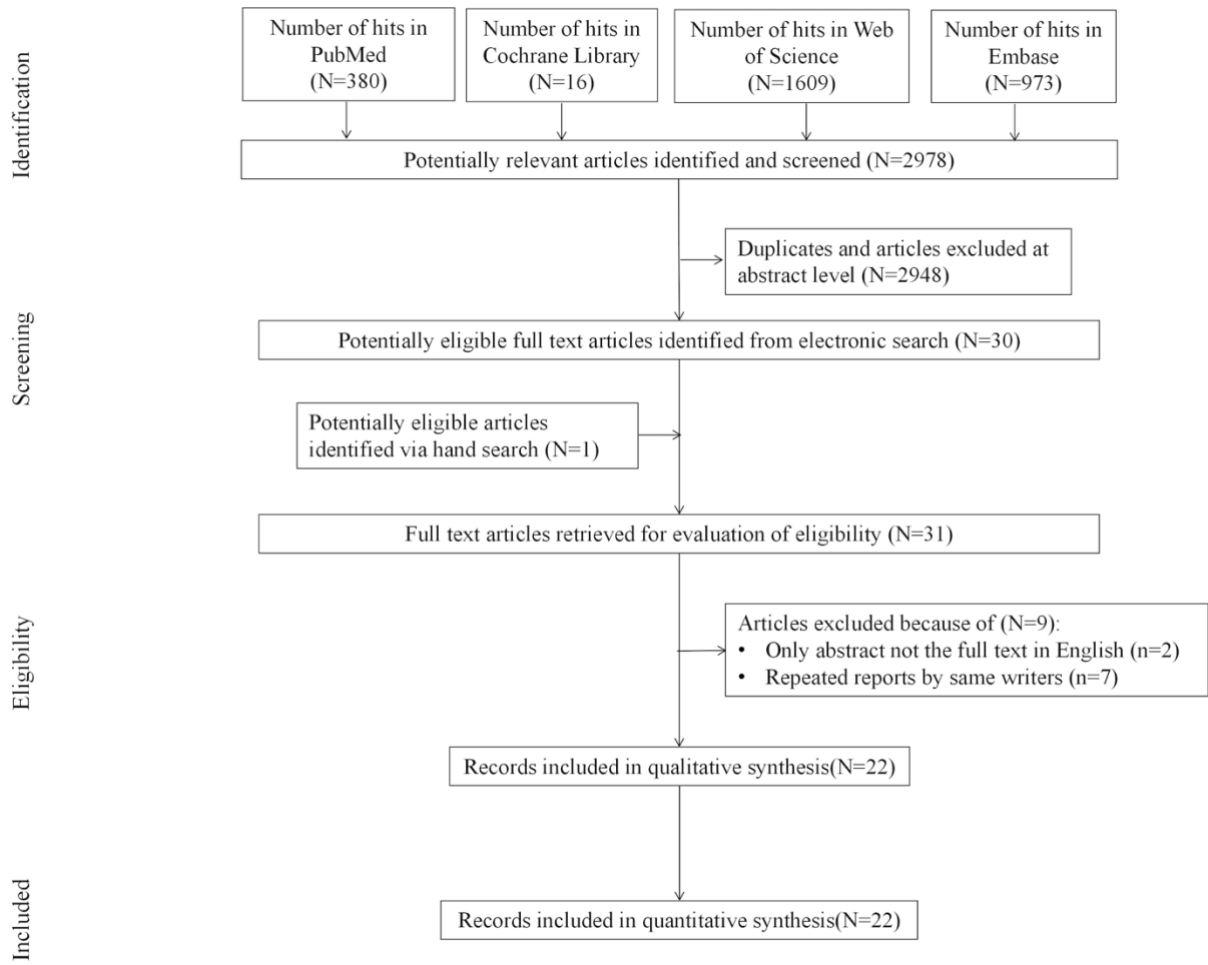
Przegląd systematyczny został przeprowadzony zgodnie z zasadami opublikowanymi w „Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses” (PRISMA). Wyszukiwanie przeprowadzono dwukrotnie w bazach danych takich jak: PubMed, EMBASE, Web of Science i Cochrane Library. Zawężono wyszukiwania do opisu badań wyłącznie na ludziach, opublikowanych do 1 maja 2022 r. wyłącznie w języku angielskim. Sprawdzone również ręcznie cytowania dostępnych prac przeglądowych i metaanaliz w celu zidentyfikowania ewentualnych dodatkowych badań możliwych do włączenia do niniejszej pracy. Przyjęto następujące kryteria włączenia: (1) Randomizowane badania kontrolowane, badania kohortowe, badania kliniczno-kontrolne, serie przypadków i opisy przypadków; (2) opublikowane w języku angielskim; (3) z populacją docelową z rozpoznaną ostrą lub przewlekłą GvHD po alloHCT; (4) w której przeprowadzono FMT; (5) i w której odnotowano którykolwiek z następujących parametrów: odsetek odpowiedzi, remisji i zdarzeń niepożądanych. Jako kryteria wyłączenia przyjęto: (1) Recenzje, eksperymenty na zwierzętach, eksperymenty w ramach nauk podstawowych i wielokrotnie publikowane te same doniesienia; (2) Brak informacji do wyodrębnienia.

Ocena jakości została przeprowadzona przez dwóch autorów niezależnie, a rozbieżności zostały rozwiązane w drodze dyskusji. Jakość badań kohortowych oceniono za pomocą skali Newcastle-Ottawa (NOS) na podstawie następujących kryteriów: reprezentatywność populacji z GvHD; otrzymanie FMT w cyklu leczenia GvHD; wykazanie, że wynik leczenia nie był obecny na początku badania; jakość wyniku - długości (co najmniej 3 miesiące) i adekwatności obserwacji. Do oceny jakości serii przypadków i badań bez grup kontrolnych wykorzystano IHE Quality Appraisal Checklist for Case Series Studies. Badania z 12 lub więcej odpowiedziami „tak” uznano za akceptowalną jakość do włączenia do przeglądu systematycznego z metaanalizą.

**Łącznie zidentyfikowaliśmy 22 publikacje opisujące 23 badania spełniające określone przez nas kryteria** w tym dwa badania z grupami kontrolnymi - były to prospektywne jednośrodkowe badanie z Rosji oraz nierandomizowane, otwarte badanie kliniczne fazy I/II z Chin. Inne badania nie miały grupy kontrolnej i było to 10 badań prospektywnych, 2 badania retrospektywne i 2 serie przypadków, a także 7 opisów przypadków (Rycina 1 i Tabela 1).

Te 23 badania podzielono na trzy grupy w zależności od rodzaju badania: odpowiednio połączono dwa badania prospektywne z grupami kontrolnymi, 10 badań prospektywnych bez grupy kontrolnej oraz pozostałe 11 badań retrospektywnych.

**Rycina 1.**



**Tabela 1.**

Study	Type of study	Disease	Number of Patients	Age	Route of Administration	Donor	Number of FMTs per patient	Follow-up days (and endpoint evaluating time in brackets)	Response (and deaths in brackets)	Adverse Events (n)
Spindelboeck et al. 2021 Austria(1, 2)	a prospective cohort study (NCT03819803) with 7 patients, and a compassionate-use program with 2 patients	steroid refractory aGVHD, stage IV	9	53, 60, 59, 24, 54, 42, 67, 39, 51	Colonoscopy	Unrelated, 6; related, 3	1~6	9-614 days (Day 90)	4 CR, 1 PR, 4 NR (4 deaths)	10 infectious events, all but one judged to be unrelated to FMTs: three cases of urinary tract infections, one case of pneumonia with Metapneumovirus, one case of gastroenteritis positive for Cytomegalovirus, and five cases of viremia (1 adenovirus infection possibly related to FMT)
Qi et al. 2018 China(3)	A pilot study (NCT03148743)	steroid refractory GI aGVHD, stage IV	8	36-40, 40-45, 26-30, 30-35, 46-50, 40-45, 28, 20	Nasoduodenal tube	Unrelated	1~2	90 days (Day 13)	4 CR, 2 PR and 2 NR (4 deaths)	One case died of intracerebral hemorrhage due to thrombocytopenia; 3 cases died after declining FMT treatment due to complications of GVHD or economic reasons
Shouval et al. 2018 Netherlands(4)	a single-arm pilot study (NCT03214289)	steroid dependent (1)/resistant (6) GI aGVHD	7	62, 41, 65, 33, 72, 64, 59	Capsules (frozen)	Unrelated	1~3	40-99 days (Day 28)	2 CR and 5 NR (4 deaths)	2 bacteremia (not related to FMT); 3 patients died due to active GVHD, while 1 to an invasive Aspergillosis of the brain
Malard et al. 2021 France(5) (HERACLES)	Phase 2 clinical trial HERACLES (NCT03359980)	Grade III-IV, steroid-resistant, GI aGVHD	24	N/A	MaaT013	Multiple Unrelated Donor	N/A	365 days (Day 28)	5 CR, 2 VGPR, 2 PR, 15 NR (18 deaths)	Well tolerated, with mild infections and gastrointestinal disorders (not clear about the disease name and number)
Malard et al. 2021 France (5) (EAP)	a compassionate use program (Early Access Program or EAP)	Steroid dependent or steroid resistant, Grade II-IV, GI aGVHD	52	N/A	MaaT013 (enema or nasogastric tube)	Multiple Unrelated Donor	1-6 (median 3)	365 days (Day 28)	17 CR, 9 VGPR, 4 PR, 22 NR (32 deaths)	1 case of sepsis (possibly related to FMT); <i>C. difficile</i> diarrhea 24 hours post-administration (not related to MaaT013)
van Lier et al. 2020 Netherlands (6)	a prospective, single-center, single-arm pilot study (ISRCTN14530574)	Steroid resistant or steroid-dependent GI aGVHD	15	57 (20-72)	Nasoduodenal tube	2 related 13 Unrelated	1	180 days (Day 28)	10 CR, 5 NR (all 5 deaths)	Pneumonia, cystitis, sepsis, otitis, discomfort of nasoduodenal tube, cramps, nausea, transient abdominal distention, regurgitation
Bilinski et al. 2020 Poland(7)	a prospective, multicenter study (NCT02461199)	Steroid refractory GVHD (11 acute, 2 chronic)	13	23-66	Nasoduodenal tube	Unrelated	1~2	17 – 757 days (After first FMT)	5 CR, 3 PR, 5 NR (all 8 deaths)	8 cases of serious adverse events: ileus/subileus, colitis, bronchopneumonia, lobar pneumonia, and one septic shock (not related to FMT)

										septic shock, sepsis, Norovirus-mediated gastrointestinal tract infection (related to FMT)
Kakihana et al.2016 Japan(8)	A Pilot Study (UMIN000015115)	Steroid resistant/dependent gut GVHD	4	64, 44, 48, 42	nasoduodenal tube	Spouse /relative	1-2	28 days	3 CR; 1 PR	3 cases of abdominal pain, 2 cases of diarrhea, 2 cases of pharyngolaryngeal pain, 1 case of belch, 1 case of nausea
Choi et al.2020 Korea(9)	A Pilot Study	refractory GI aGVHD	4	N/A	upper endoscopy or colonoscopy (frozen)	unrelated	1-4	N/A	3 PR, 1NR (3 deaths)	Bacteremia (n=3, not related to FMT)
Goloshchapov et al.2021 Russia(10)	a prospective single-center study	aGVHD grade II-IV	7	3-10	2 EGD; 2 EGD+ nasointestina 1 tube; 3 gelatin capsules with frozen fecal microbiota	3 relatives; 4 unrelated	2~10	320-1964 days (Day 120)	5CR, 1PR, 1NR (1 death)	Nausea, abdominal pain and stomach rumbling (43%), subfebrile rise of body temperature (29%), vomiting, pronounced abdominal flatulence and intestinal paresis (14%)
Goloshchapov et al.2020 Russia(11, 12)	a prospective single-center study	Steroid refractory GI GVHD (15 acute, 4 chronic; 10 cases stage IV)	FMT 19; control group 8	FMT group: 22 (3-49) Control group: 27 (1-52)	3 EGD, 7 nasointestinal tube, 13 gelatin capsules, 4 placebo capsules	15 Unrelated, 4 related	2~10	120 days (Day 30)	FMT group: 9 CR, 9 PR, 1 NR (1 death); control group: 1 CR, 4 PR, 3 NR (3 deaths)	Nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhea, constipation, fever, flatulence, intestinal paralysis, anorexia (milder in the FMT group than control)
Zhao et al. 2021 China(3)	a non-randomized, open-label, phase I/II, clinical study (NCT 03148784)	Steroid refractory GI GVHD	FMT 23; control group 18	FMT group: 30 (13-55) Control group: 31.5 (13-59)	nasojejunal or nasogastric tube	Unrelated	1~7	median >539 days in the FMT group and 107 days in the control group (Day 28)	FMT group: 18 CR, 2 PR, 3NR (3 deaths); control group: 6 CR, 5 PR, 7 NR (3 deaths) (28 days)	Thrombocytopenia, cardiac event, subileus, fever, vomiting, rash
Huang et al.2021 China(13)	Retrospective study	Steroid refractory acute (18, grade II or III) and chronic (11) GVHD	29	16~61	N/A	N/A	1-3	N/A	7CR, 3PR 8 NR in aGVHD; 6PR 5 NR in cGVHD	11 fever, 3 fecal bacterial culture positive, 2 constipation. No serious adverse events.
Goeser et al. 2021 Germany(14)	Retrospective study	Steroid refractory GI aGVHD	11	53.8 (30-76)	2 naso-jejunal tube;	2 related 9 unrelated	1	30 days (Day 30)	8 PR, 3 NR (1 death)	Abdominal pain, bloating in 3 cases, vomiting in 1 case (all mild); one patient died of CMV bacteremia (not related to FMT)

					9 oral capsules					
Chakrabartty et al.2020 India(15)	Case series	Steroid refractory gut aGVHD	4	54, 32, 14, 14	naso-jejunal tube	unrelated	4 (3 patients) or 8 (1 patient)	14 days	3 CR; 1 PR (2 deaths)	No AEs
Bilinski et al.2021 Poland(16)	Case series	Steroid resistant GVHD	4	66, 52, 55, 22	nasoduodenal tube	2 related 2 unrelated	3 or 6	264 to 398 days	3 CR 1 PR (2 deaths)	No serious AEs
Merli et al.2020 Italy(17)	Case report	Steroid resistant aGVHD	2	1.4-18	EGD	Unrelated or relatives	2	30 days (7 days)	1 CR; 1 NR	fever, chills and malaise (negative blood culture)
Wong et al.2018 America(18)	Case report	grade IV GI-GVHD	1	6	gastrojejunoscopy tube and colonoscopy	Unrelated	1	180 days (28 days)	1 CR	No AEs
Zhang et al.2019 China(19)	Case report	Steroid resistant grade IV gut GVHD	1	14	Duodenojejunal tube	Unrelated	4	120 days	1 PR	No AEs
Biernat et al.2020 Poland(20)	Case report	Steroid resistant grade IV gut GVHD	2	25, 32	NT	Unrelated	3 and 4	128 days	1 CR 1 PR (2 deaths)	No serious AEs
Kaito et al.2018 Japan(21)	Case report	Steroid resistant grade IV gut GVHD	1	21	Oral capsules (frozen)	relative	2	90 days	1 PR	Transient fever, positivity of galactomannan antigen, and recurrence of herpes zoster
Mao et al.2020 China(22)	Case report	Steroid resistant grade IV gut GVHD	1	1	Oral capsules	unrelated	2	60 days	1 CR	No serious AEs
Zhong et al.2019 China(23)	Case report	Steroid resistant grade III gut GVHD	1	2	gastroduodenal tube	unrelated	2	90 days	1 CR	No serious AEs
<b>Total</b>			<b>FMT: 242; Control: 26</b>		<b>FMT: capsules 34; Colonoscopy 9; MaaT013 76; NT or/and EGD 89; Colonoscopy + NT 1; Colonoscopy or NT 4;</b>	<b>Unrelated: 190; related:21; N/A: 31</b>	<b>1-10</b>		<b>FMT (overall 66.5%): 100 (41.3%) CR, 61 (25.2%) PR, 81 (33.5%) NR (90 deaths); Control: 7 (26.9%) CR, 9 (34.6%) PR, 10 (38.5%) NR (6 deaths)</b>	<b>SAE related to FMT: 1 septic shock, 2 sepsis, 1 Norovirus-mediated gastrointestinal tract infection; 1 adenovirus infection</b>



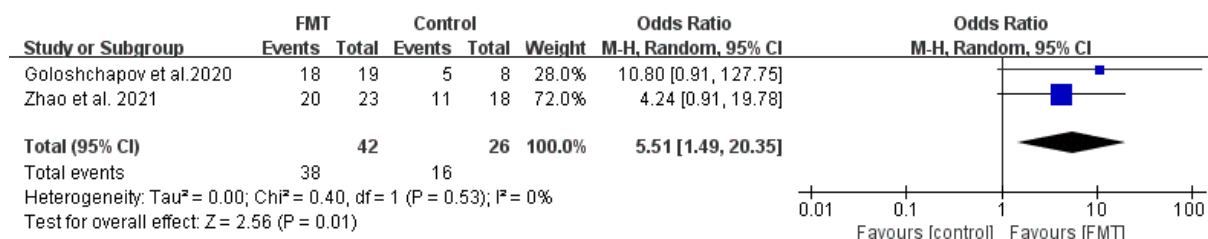
Skróty: aGVHD: acute Graft-versus-host disease; CR: complete response; PR: partial response; NR: no response; NT: nasoduodenal tube or nasogastric tube; EGD: esophagogastroduodenoscopy; N/A: not available; FMT: Fecal microbiota transplantation

### Bibliografia do Tabeli 1.

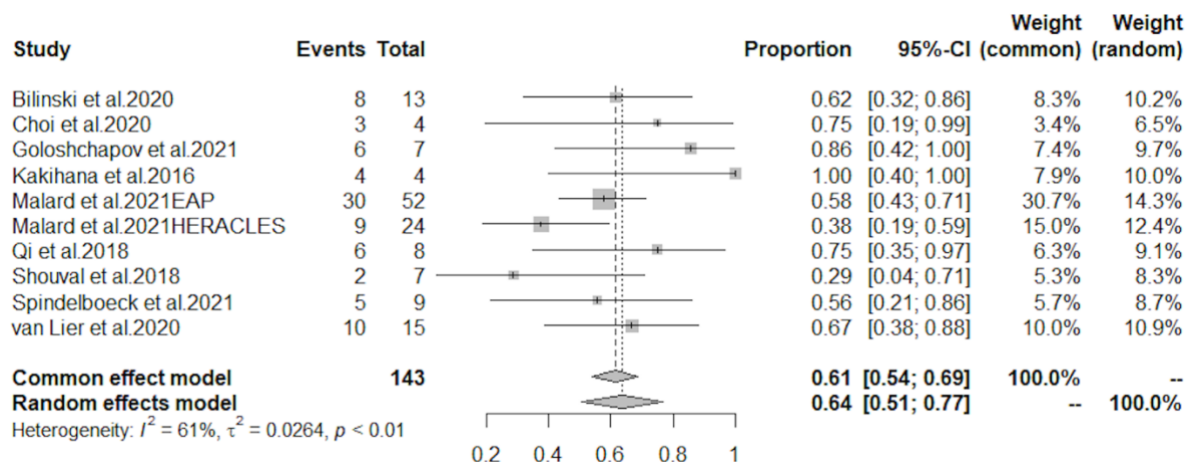
1. Spindelböck W, Huber-Krassnitzer B, Uhl B, Gorkiewicz G, Greinix H, Högenauer C, et al. Treatment of acute refractory gastrointestinal graft-versus-host-disease by fecal microbiota transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2019;54:294-5.
2. Spindelboeck W, Halwachs B, Bayer N, Huber-Krassnitzer B, Schulz E, Uhl B, et al. Antibiotic use and ileocolonic immune cells in patients receiving fecal microbiota transplantation for refractory intestinal GvHD: a prospective cohort study. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2021;12:20406207211058333.
3. Qi X, Li X, Zhao Y, Wu X, Chen F, Ma X, et al. Treating Steroid Refractory Intestinal Acute Graft-vs.-Host Disease With Fecal Microbiota Transplantation: A Pilot Study. *Front Immunol*. 2018;9:2195.
4. Shouval R, Youngster I, Geva M, Eshel A, Danylesko I, Shimoni A, et al. Repeated courses of orally administered fecal microbiota transplantation for the treatment of steroid resistant and steroid dependent intestinal acute graft vs. host disease: A pilot study (NCT 03214289). *Blood*. 2018;132.
5. Malard F LF CJMF, Legrand F, Cornillon J <https://www.maapharma.com/maat-pharma-presents-promising-clinical-data-from-76-patients-with-acute-graft-vs-host-disease-treated-with-maat013-at-63rd-ash-annual-meeting/2021>
6. van Lier YF, Davids M, Haverkate NJE, de Groot PF, Donker ML, Meijer E, et al. Donor fecal microbiota transplantation ameliorates intestinal graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Science Translational Medicine*. 2020;12.
7. Bilinski J, Lis K, Tomaszewska A, Grzesiowski P, Dzieciatkowski T, Tyszka M, 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*. 2020.
8. Kakhana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, et al. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood*. 2016;128(16):2083-8.
9. Choi IH, Cho YW, Oh CK, Lee HH, Park SS, Lee JW, et al. Frozen fecal microbiota transplantation for patients with steroid resistant gastrointestinal graft-versus-host disease. *United European Gastroenterology Journal*. 2020;8(8 SUPPL):494.
10. Goloshchapov OV, Bakin EA, Stanevich OV, Klementeva RV, Shcherbakov AA, Shvetsov AN, et al. Clinical and immune effects of fecal microbiota transplantation in children with acute graft-versus-host disease. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2021;10(1):69-78.
11. Goloshchapov OV, Bakin EA, Kucher MA, Stanevich OV, Suvorova MA, Gostev VV, et al. *Bacteroides fragilis* is a potential marker of effective microbiota transplantation in acute graft-versus-host disease treatment. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2020;9(2):47-59.
12. Goloshchapov OV, Chukhlovina AB, Bakin EA, Stanevich OV, Klementeva RV, Shcherbakov AA, et al. Fecal microbiota transplantation for graft-versus-host disease in children and adults: methods, clinical effects, safety. *Ter Arkh*. 2020;92(7):43-54.
13. Huang F, Lv P, Liu Q. Efficacy and Safety of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Acute and Chronic Steroid-Refractory Graft-Versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 2021;138(Supplement 1):4884-.
14. Goeser F, Sift B, Stein-Thoeringer C, Farowski F, Strassburg CP, Brossart P, et al. Fecal microbiota transfer for refractory intestinal graft-versus-host disease - experience from two German tertiary centers. *Eur J Haematol*. 2021.
15. Chakrabarty J, Kathrotiya M, Sengupta K, Gupta P. Fecal Microbiota Transplant: Is It an Effective Option for Treating Steroid Refractory Acute Graft Versus Host Disease of Gut? *Blood*. 2020;136(Supplement 1):30-1.
16. Bilinski J, Jasinski M, Tomaszewska A, Lis K, Kacprzyk P, Chmielewska L, et al. Fecal microbiota transplantation with ruxolitinib as a treatment modality for steroid-refractory/dependent acute, gastrointestinal graft-versus-host disease: A case series. *American Journal of Hematology*. 2021;96(12):E461-+.
17. Merli P, Galaverna F, Becilli M, Algeri M, Gaspari S, Quagliarella F, et al. Fecal microbiota transplantation in children to treat acute GVHD or multi-drug resistant bacteria colonization. *Bone Marrow Transplantation*. 2020;55:463.
18. Wong WF, Budree S, Osman M, Panchal P, Kassam Z, Corkins MR, et al. Tu1882 - Fecal Microbiota Transplantation Improves Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease and Restores the Microbiome: A Pediatric Experience. *Gastroenterology*. 2018;154(6):S-1046-S-7.
19. Zhang F, Yeoh YK, Cheng F, Zuo T, Tang W, Cheung K, et al. Rapid and durable engraftment of donor fungi and bacteria after successful fecal microbiota transplantation in acute graft-versus-host disease: intensive serial metagenomic study. *Gastroenterology*. 2019;156(6):S-1157-S-8.
20. Biernat MM, Urbaniak-Kujda D, Dybko J, Kapelko-Slowik K, Prajs I, Wrobel T. Fecal microbiota transplantation in the treatment of intestinal steroid-resistant graft-versus-host disease: two case reports and a review of the literature. *J Int Med Res*. 2020;48(6):300060520925693.
21. Kaito S, Toya T, Yoshifuji K, Kurosawa S, Inamoto K, Takeshita K, et al. Fecal microbiota transplantation with frozen capsules for a patient with refractory acute gut graft-versus-host disease. *Blood Adv*. 2018;2(22):3097-101.
22. Mao D, Jiang Q, Sun Y, Mao Y, Guo L, Zhang Y, et al. Treatment of intestinal graft-versus-host disease with unrelated donor fecal microbiota transplantation capsules: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(38):e22129.
23. Zhong S, Zeng J, Deng Z, Jiang L, Zhang B, Yang K, et al. Fecal microbiota transplantation for refractory diarrhea in immunocompromised diseases: a pediatric case report. *Ital J Pediatr*. 2019;45(1):116.

Spośród wszystkich 23 badań włączonych do metaanalizy łącznie 242 pacjentów z GvHD po alloHCT leczono FMT (Tabela 1). Większość miała aGVHD stopnia III lub IV, podczas gdy 26 pacjentów zakwalifikowanych było jako grupa kontrolna w 2 badaniach. **Wśród wszystkich pacjentów, którzy otrzymali FMT, 161 (66,5%) odpowiedziało na leczenie, w tym 100 uzyskało całkowite remisje (CR), 61 częściowe remisje (PR) i 81 nie uzyskało odpowiedzi na leczenie (NR).** Wyniki metaanalizy 2 badań prospektywnych z grupami kontrolnymi przedstawiono na Rycinie 2, wyniki prospektywnych badań jednoramiennych przedstawiono na Rycinie 3, a na Rycinie 4 przedstawiono wynik po połączeniu badań retrospektywnych, serii przypadków i opisów przypadków. **Oszacowany iloraz szans obiektywnej odpowiedzi (OR) wyniósł 5,51 (95% CI 1,49-20,35) w badaniach dwuramiennych, przy niskiej heterogeniczności ( $\text{Chi}^2 = 0,40, \text{df} = 1, P = 0,53; I^2 = 0\%$ ).** Łączny wskaźnik remisji klinicznej (całkowitej i częściowej odpowiedzi) GvHD po FMT wyniósł 64% (51%-77%) w 10 prospektywnych badaniach jednoramiennych i 81% (62%-95%) w badaniach retrospektywnych (2 badania), seriach przypadków (2 badania) i opisach przypadków (7 badań).

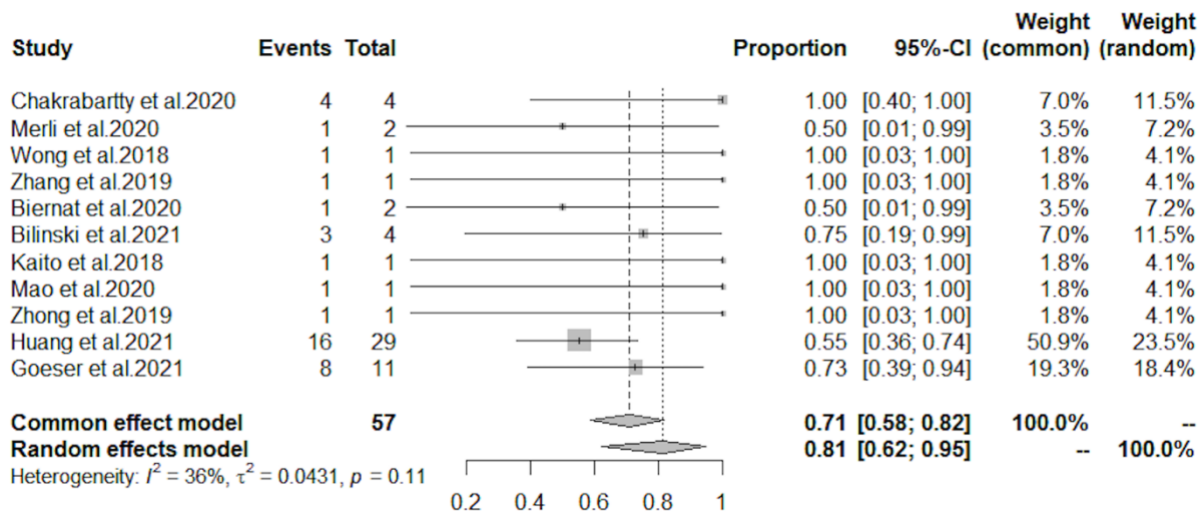
Rycina 2.



Rycina 3.



#### Rycina 4.



Drogi i metody podawania FMT były zróżnicowane: 34 biorców otrzymało FMT za pomocą kapsułek doustnych, 9 otrzymało świeży lub mrożony roztwór mikrobioty jelitowej za pomocą kolonoskopii, 89 przez sondę nosowo-dwunastniczą i/lub gastroduodenoskopię oraz 76 stosowało „MaaT013” (pulowaną mikrobiotę jelitową francuskiej firmy Maat Pharma) przez sondę nosowo-żołądkową lub wlewkę doodbytniczą. Wskaźnik odpowiedzi po podaniu FMT przez górny odcinek przewodu pokarmowego (przez sondę nosowo-dwunastniczą lub gastroduodenoskopię) był lepszy (79,22%), podczas gdy pozostałe drogi podania uzyskały podobne wyniki (Tabela 2). W sumie 21 (8,7%) biorców otrzymało mikrobiotę od dawcy spokrewnionego, a wszyscy pozostali pacjenci od dawców niespokrewnionych.

Liczba FMT przeprowadzonych na pacjenta w większość przypadków wahała się od 1 do 3, choć odnotowano także 10 podań mikrobioty w cyklu leczenia GvHD.

Odnotowano następujące działania niepożądane: infekcje, nudności, wymioty, bóle brzucha, biegunki, zaparcia, wzdęcia brzucha, gorączka, jadłowstręt, ogólne złe samopoczucie, a także ból gardła i krwawienia z przewodu pokarmowego. Zakażenia występowały z większą częstością w porównaniu z FMT wykonywaną w leczeniu zakażeń *C. difficile*. Chociaż większość infekcji zgłoszonych u pacjentów z GvHD uznano za niezwiązanych z FMT, 5 biorców przeszło ciężkie infekcje związane z FMT, z 2 przypadkami sepsy, 1 wstrząsem septycznym, 1 infekcją norowirusem i 1 infekcją adenowirusem. U wszystkich 5 pacjentów doszło do wyleczenia działań niepożądanych dzięki włączonemu leczeniu. Zgłoszono łącznie 90 zgonów, ale żaden nie dotyczył FMT.

**Podsumowując, w niniejszym przeglądzie systematycznym z metaanalizą wykazano (głównie na podstawie badań niskiej jakości), że FMT ma pozytywny wpływ terapeutyczny na leczenie GvHD z OR na poziomie 5.51.** FMT można uznać za bezpieczną i obiecującą metodę leczenia GvHD, ale bardzo ścisły monitoring i nadzór nad pacjentem poddawany tej formie terapii jest konieczny, w związku z szczególnie wrażliwą populacją, jaką są pacjenci z jelitową postacią GvHD, w immunosupresji. Ilość podań FMT, droga podania, częstotliwość i dawka FMT wymagają dalszych badań i standaryzacji. Mechanizm działania FMT w GvHD jest prawdopodobnie związany ze wzrostem różnorodności mikrobioty jelitowej, ale szczegóły pozostają niejasne i wymagają dalszego wyjaśnienia w ramach badań podstawowych oraz próbek klinicznych. Trwa kilka badań oceniających skuteczność FMT w leczeniu aGvHD (NCT04269850, NCT03819803, NCT03812705, NCT04285424, NCT03359980), których wyniki powinny dostarczyć nam bardziej wiarygodnych danych oraz jest przygotowywane badanie kliniczne, randomizowane przez autora niniejszego Autoreferatu.

### c. WNIOSKI

1. Ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGvHD) jest częstym, zagrażającym życiu powikłaniem po przeszczepieniu allogenicznych hematopoetycznych komórek krwiotwórczych (alloHCT), które występuje u 25 do 50% biorców alloHCT i jest drugą najczęstszą przyczyną śmierci (po nawrocie choroby podstawowej) w tej grupie chorych.
2. Zastosowanie różnych metodologii oceny mikrobioty jelitowej (w tym przypadku klasycznych posiewów tlenowych i beztlenowych, ocenę komórkowości i żywotności za pomocą cytometrii przepływowej oraz sekwencjonowanie NGS) dawców, daje więcej danych i informacji niż każda metoda z osobna.
3. W mikrobiocie jelitowej przetwarzanej w celu wykonania FMT, oprócz komórek żywych i martwych występuje dodatkowa frakcja komórek niebarwiąca się odczynnikami znakującymi komórki żywe lub martwe, która może stanowić równie ważne spory bakteryjne.
4. Zamrażanie całego kału bez żadnego buforu kriokonserwującego znacząco zmienia profil mikrobioty jelitowej i czterokrotnie obniża żywotność komórek bakteryjnych. Zmianę tę można wykryć przede wszystkim za pomocą połączenia różnych metod analitycznych, w szczególności cytometrii przepływowej i hodowli klasycznych. Ma to kolosalne znaczenie dla wnioskowania jak przygotowywać preparaty do FMT, szczególnie dla pacjentów z innymi niż zakażenia *C. difficile* chorobami, szczególnie GvHD.
5. Transplantacja mikrobioty jelitowej okazała się być obiecującą metodą leczenia chorych ze sterydooporną i sterydozależną aGvHD, z ogólnym odsetkiem odpowiedzi (ORR) wynoszącym 57% (8/14 FMT), w tym całkowitą remisją (CR) występującą po wykonaniu 42% (6/14) FMT, co wobec braku alternatywnych skutecznych metod leczenia obliguje do prowadzenia dalszych badań nad tą formą terapii.
6. U pacjentów opornych na leczenie FMT, przebieg aGvHD się nie zmienia (wszyscy pacjenci oporni na leczenie FMT zmarli w ciągu 200 dni po zabiegu, a mediana przeżycia całkowitego (OS) wyniosła 66 dni), natomiast u pacjentów, u których uzyskano odpowiedź na leczenie FMT wykazano (istotny statystycznie) trend w kierunku poprawy całkowitego przeżycia (mediana OS w tej grupie chorych - 332 dni).

7. Procedura jest obarczona wyższym ryzykiem zdarzeń niepożądanych niż statystyki podawane dla innych wskazań terapeutycznych, a część działań niepożądanych może być związana z samą procedurą FMT.
8. Im wcześniej w przebiegu choroby wykonane FMT, tym procedura jest bezpieczniejsza i wiąże się z mniejszą ilością działań niepożądanych.
9. Zaobserwowano addytywny efekt działania FMT w stosunku do ruxolitiniu co może pozwolić nie tylko zmniejszyć stosowaną dawkę ruxolitiniu w leczeniu drugiej linii aGvHD (niwelując jego działania niepożądane), ale globalnie uzyskać dużo lepsze wyniki końcowe. Optymalnym protokołem leczenia aGvHD wydaje się być połączenie leku immunomodulującego (ruxolitiniu) z FMT podawanej w sesjach (wielokrotnie) po uprzednim przygotowaniu pacjenta.
10. W przeprowadzonej metaanalizie wykazano, że na moment jej sporządzenia, wśród 242 pacjentów, którzy otrzymali FMT w celu leczenia sterydoopornej i sterydozależnej aGvHD, oszacowany iloraz szans obiektywnej odpowiedzi (OR) wyniósł 5,51 w badaniach dwuramiennych, przy niskiej heterogeniczności, a łączny wskaźnik remisji klinicznej (całkowitej i częściowej odpowiedzi) wyniósł 64% (51%-77%) w 10 prospektywnych badaniach jednoramiennych i 81% (62%-95%) w badaniach retrospektywnych.

#### **d. MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA WYNIKÓW BADAŃ**

Wyniki badań przedstawionego osiągnięcia mogą być bardzo szeroko wykorzystane. Opracowanie metodologii badania mikrobioty jelitowej za pomocą trzech najbardziej istotnych metod badawczych, opisanych w niniejszym autoreferacie, pozwala ustalić protokół kwalifikacji i standaryzacji mikrobioty jelitowej wykorzystywanej do leczenia ludzi. Ma to znaczenie nie tylko w leczeniu aGvHD, ale każdej choroby i stanu klinicznego w którym może być wykorzystane FMT. Według wiedzy autora niniejszego autoreferatu obecnie w Komisji Europejskiej opracowywana jest dyrektywa, która włącza mikrobiotę jelitową jako „Substance of Human Origin (SoHO)”. Bardzo ważnym elementem powinna być standaryzacja wytwarzania preparatów mikrobioty jelitowej i wskazanie metod badania parametrów, które powinna osiągnąć mikrobiota do stosowania u ludzi (poza skринingiem dawców). Wierzę, że moje badania posłużą do opracowania protokołów takiej standaryzacji.

Wyniki zaprezentowane w pracy nr 2 wskazują jasno, że proces zamrażania i rozmrażania materiału wyjściowego bez dodawania krioprezerwantów negatywnie wpływa na parametry

jakościowe mikrobioty jelitowej (spadek żywotności komórek bakteryjnych, zmiana profilu taksonomicznego). Ma to szczególne znaczenie w przypadku aplikowania preparatów mikrobioty jelitowej w schorzeniach innych niż *C. difficile* (jako modelu choroby jednoczynnikowej vs. chorób o złożonym patomechanizmie). Wyniki pracy mogą posłużyć opracowaniu protokołu przygotowywania mikrobioty do transferu. W późniejszych pracach, które są obecnie opracowywane do publikacji i w ramach powołanego laboratorium badawczo-rozwojowego Human Biome Institute, jako kontynuacji mojej pracy badawczej i wdrożeniowej, opracowano technologię wytwarzania mikrobioty jelitowej, i standaryzacji jej parametrów jakościowych, stosując wyniki niniejszej pracy.

W kolejnych pracach (praca nr 3, 4 i 5) wykazano, że transplantacja mikrobioty jelitowej może być obiecującą alternatywą dla pacjentów leczonych w ośrodkach transplantacyjnych z powodu sterydoopornej i sterydozależnej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Należy wskazać, że już w wytycznych Europejskiego Towarzystwa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (EBMT), największego autorytetu dla transplantologów i największej organizacji zajmującej się omawianym tematem, między innymi dzięki moim doniesieniom naukowym, zjazdowym (moje prezentacje na sesjach EBMT oraz w grupie roboczej EBMT ds. powikłań wczesnych alloHCT), umieszczono FMT jako alternatywna opcja leczenia drugiej linii w sterydoopornej i sterydozależnej aGvHD (Penack O et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol.* 2020;7(2):e157-e167). Wierzę, że badania omawiane w niniejszym cyklu publikacji pozwolą na co najmniej utrzymanie FMT w tych rekomendacjach przy ich aktualizacji, oraz dadzą kolejne bodźce dla świata nauki do prowadzenia badań randomizowanych z wykorzystaniem FMT i dostarczenia najwyższej dowodowości o skuteczności tej procedury. Opracowane przeze mnie i zespół protokoły leczenia chorych już stanowią wzór do leczenia chorych nie tylko w Polsce, ale i na świecie (konsultacje prowadzone przeze mnie dla zainteresowanych lekarzy ze świata) i stanowią podstawę opracowywania kolejnych badań, na bazie wypracowanych schematów.

## **5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI**

### **a. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO NA PODSTAWIE ANALIZY BIBLIOMETRYCZNEJ**

Szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Bibliotekę Uczelnianą Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego została przedstawiona w załączniku 4.

**Jestem autorem bądź współautorem 35 publikacji w czasopismach naukowych, w tym 30 publikacji w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR) z Impact Factor.**

**Podsumowanie danych bibliometrycznych:**

**Łączny, sumaryczny Impact Factor: 210,528** (wg listy *Journal Citation Reports* wg roku opublikowania)

**Punktacja MNiE: 2929**

-----

**Poniżej, dane bibliometryczne przygotowane przez Bibliotekę Uczelnianą WUM o Nr Referencyjnym BIBG/Punktacja/334/2023/KK**

**Przed uzyskaniem stopnia doktora:**

**Impact Factor: 19,089**

**Punktacja MEiN: 157**

**Po uzyskaniu stopnia doktora:**

**Impact Factor: 184,915** (w tym 58,331 za prace oryginalne w suplementach)

**Punktacja MEiN: 2512** (w tym 280 za prace oryginalne w suplementach)



**Łącznie (przed i po uzyskaniu stopnia doktora) bez listów do redakcji i prac w badaniach wielośrodkowych:**

**Impact Factor: 204,004**

**Punktacja MEiN: 2669**

**Index Hirsha:**

**11 (wg bazy Google Scholar z dn. 6.06.2023; dane nie ukazane w analizie biblioteki)**

**8 (wg bazy Web of Science z dn. 6.06.2023 i raportu Biblioteki WUM)**

**8 (wg bazy Scopus z dn. 6.06.2023 i raportu Biblioteki WUM)**

**Liczba cytowań (bez autocytowań)**

**679 (wg bazy Google Scholar z dn. 6.06.2023; dane nie ukazane w analizie biblioteki)**

**409 (wg bazy Web of Science z dn. 6.06.2023 i raportu Biblioteki WUM)**

**443 (wg bazy Scopus z dn. 6.06.2023 i raportu Biblioteki WUM)**

## **b. OPIS AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ POZA OSIĄGNIĘCIEM O KTÓRYM MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY**

W swojej działalności naukowej koncentruję się na kompleksowym rozwoju obecnej wiedzy w zakresie przyczyn, diagnostyki i leczenia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) i powikłań infekcyjnych u pacjentów poddawanych transplantacji szpiku (ogólnie powikłań poprzyszczepowych, zarówno po allogenicznych jak i autologicznych przeszczepieniach). Moja koncentracja naukowa to także immunologia, immunoonkologia (przyczyny nowotworzenia i ucieczki spod nadzoru immunologicznego, leczenie biologiczne, immunoterapia). Od około 10 lat zajmuję się naukowo mikrobiomem człowieka jako potencjalnym (co obecnie jest już udowodnione) immunomodulatorem i potężnym ładunkiem antygenowym wpływającym przede wszystkim na odpowiedź odpornościową i komunikację

(„cross talk”) mikrobioty z gospodarzem, a także w mechanizmie „oporności kolonizacji”. W ramach badań nad mikrobiotą jelitową w kontekście powikłań nie tylko alloHCT ale także leczenia pacjentów z nowotworami szpiku, wraz z zespołem wykazałem, że kolonizacja jelit bakteriami antybiotykoopornymi jest markerem dysbiozy jelitowej (nieprawidłowego składu i funkcji mikrobioty) co jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu u pacjentów poddawanych alloSCT (ponad 3-krotny wzrost ryzyka zgonu w okresie 2 lat po transplantacji). Opracowaliśmy protokół i przeprowadziliśmy pierwsze na świecie badanie prospektywne z przeszczepianiem mikrobioty jelitowej w celu dekolonizacji bakterii antybiotykoopornych z przewodu pokarmowego pacjentów, uzyskując bardzo dobre rezultaty. Swoje badania opieram na metodach molekularnych (m. in. metagenomika) oraz metodach klinicznych prowadząc badania bezpośrednio u pacjentów. Jestem jednym z liderów światowych tematyki FMT w kontekście antybiotykooporności i GvHD, mając w tej materii jedne z pierwszych na świecie prac, doniesień zjazdowych czy publikacji naukowych, które były już setki razy cytowane.

Moja praca była wielokrotnie doceniana, m. in. w toku studiów na kierunku lekarskim byłem laureatem wielu konkursów oraz Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Ukończyłem rok przed planem studia doktoranckie w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym i w 2017r obroniłem z wyróżnieniem rozprawę doktorską na I Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jestem Laureatem prestiżowej Nagrody Wydziałowej V Wydziału Lekarskiego Polskiej Akademii Nauk. W 2020 roku zostałem wybrany „Młodym Ambasadorem Europejskiego Towarzystwa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (EBMT) oraz zwycięzcą w konkursie „Złoty OTIS” w kategorii „debiut naukowy roku”.

Współpracuję z innymi ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą, m. in. z Imperial College London, UK; International Society of Microbiota, Tokyo, Japonia; Europejskim Towarzystwem ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (EBMT); Research Branch, Sidra Medicine, Doha, Qatar; Instytutem Kochoa Université de Paris, Francja; Peking University Health Science Center, Pekin, Chiny; Peking University Aerospace School of Clinical Medicine, Pekin, Chiny; School of Medicine, University of Zagreb, Zagrzeb, Chorwacja; Clinical-Microbiomics, Kopenhaga, Dania; Uniwersytetem Warszawskim; Pomorskim Uniwersytetem Medycznym w Szczecinie; Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu; Uniwersytetem Medycznym w Łodzi; Uniwersytetem Łódzkim; Narodowym Instytutem Kardiologii w Warszawie; Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Jestem kierownikiem, współbadaczem, współkierownikiem w następujących grantach naukowych i projektach badawczych:

### **GRANTY NAUKOWE:**

1. Kierownik grantu naukowego Agencji Badań Medycznych o numerze 2022/ABM/03/00044, pt. „Multicenter, randomized, open-label, three-arm study on the efficacy of fecal microbiota transplantation vs probiotic therapy vs eubiotic-gut-microbiota-boosting diet in order to antibiotic-resistant bacteria (ARB) decolonization from the gastrointestinal tract of patients colonized with clinically most significant ARBs. Looking for a strategy to overcome the WHO alarm on the antibiotic resistance “new pandemic” threat. STOP-ARB study” 2023-2027 kwota 5 mln zł
2. Współbadacz w grantie naukowym Agencji Badań Medycznych o numerze 2022/ABM/03/00047, pt. „Multicenter, randomized, open-label, four-arm study on the efficacy of fecal microbiota transplantation vs bezlotoxumab vs fidaxomicin vs vancomycin in the treatment and relapse prophylaxis of Clostridioides difficile infection. STOP-CDI study” 2023-2027 kwota 5 mln zł
3. Kierownik grantu naukowego na prowadzenie prac przedwdrożeniowych, w ramach programu „Inkubator Innowacyjności+ 4.0” MNiSW finansowanych w ramach funduszy unijnych (POIR) pt. „Analiza mikro RNA w korelacji z profilem mikrobioty jelitowej w celu poszukiwania biomarkerów głównych powikłań poprzyszczepowych opartych o mikrobiotę jelitową u pacjentów poddawanych przeszczepianiu krwiotwórczych komórek macierzystych” 2021-2022, kwota 100 000 zł
4. Kierownik grantu naukowego z ramienia WUM – „Różnorodność językowo-kulturowa w służbie medycyny - badanie tradycyjnych społeczności należących do mniejszości etnicznych jako potencjalnych superdawców mikrobioty jelitowej” – grant prowadzony w ramach współpracy WUM i UW „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza” nr grantu BOB-661-326/2021, kwota 100 000 zł
5. Kierownik grantu naukowego Agencji Badań Medycznych o numerze 2020.ABM.COVID19.0048, pt. „Badanie kliniczne wieloośrodkowe, randomizowane, podwójnie zaślepienie, kontrolowane placebo oceniające wpływ transplantacji mikrobioty jelitowej pełniącej funkcję modulatora odpowiedzi zapalnej (immunomodulacja), dołączonej do terapii standardowej, na redukcję ryzyka progresji choroby COVID19 z nasilającą się burzą cytokinową i procesem zapalnym” – ponad 4 mln 200 tys zł

6. Kierownik grantu naukowego w konkursie na Grant na prowadzenie prac przedwdrożeniowych, w ramach programu „Inkubator Innowacyjności+” MNiSW finansowanych w ramach funduszy unijnych (POIR) pt. „Mikrobiota Polaka – brakujący element” - określenie struktury mikrobioty jelitowej zdrowego mieszkańca Polski (enterotypu) za pomocą Sekwencjonowania Następnej Generacji dla celów diagnostyki klinicznej.” (2017-2018) 1WP/FS200/ZW3, kwota 100 000 zł
7. Kierownik grantu naukowego w konkursie na Grant na prowadzenie prac przedwdrożeniowych, w ramach programu „Inkubator Innowacyjności+” MNiSW finansowanych w ramach funduszy unijnych (POIR) pt. „Walidacja autorskiej technologii konserwacji mikrobioty jelitowej uzyskanej od zdrowych dawców celem jej wykorzystania do transferu.” (2017-2018) 1WP/FS200/ZW2/17, kwota 100 000 zł
8. Kierownik grantu naukowego w konkursie na Grant na prowadzenie prac przedwdrożeniowych, w ramach programu „Inkubator Innowacyjności+” MNiSW finansowanych w ramach funduszy unijnych (POIR) pt. „Opracowanie gotowych zestawów do kolekcji kału oraz transferu preparatów mikrobioty jelitowej do zastosowania w procedurze transplantacji mikrobioty jelitowej.” (2017-2018) 1WP/FS200/ZW/17, kwota 100 000 zł

#### **PROJEKTY BADAWCZE:**

1. Główny badacz (Principle investigator) – badanie retrospektywne w ramach Europejskiego Towarzystwa ds. Transplantacji Szpiku i Krwi (EBMT Transplant Complications Working Party) “Fecal microbiota transplantation in the treatment of graft-versus-host disease – retrospective survey”
2. Współopiekun grantu Preludium NCN – „Rola mikrobioty jelitowej w patogenezie dyskrazji plazmocytowych” – główny badacz lek. Marcin Jasiński

#### **Poniżej wyróżniłem wybrane prace z głównych obszarów naukowych zainteresowań:**

##### **Publikacje z IF:**

1. 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>

3. **Biliński J**, Jasiński M, Basak GW. The Role of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. *Biomedicines*. 2022; 10(4):837. doi: 10.3390/biomedicines10040837
4. Jasiński M, **Biliński J**, Basak GW. The Role of the Crosstalk Between Gut Microbiota and Immune Cells in the Pathogenesis and Treatment of Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2022; 13:853540. doi: 10.3389/fimmu.2022.853540
5. Gebrayel P, Nicco C, Al Khodor S., **Bilinski J**, (...), Edeas M. Microbiota medicine: towards clinical revolution. *Journal of Translational Medicine* 2022;20:111 <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03296-9>
6. Ozierański K, Tymińska A, Skwarek A, Kruk M, Koń B, **Biliński J**, Opolski G, Grabowski M. Sex Differences in Incidence, Clinical Characteristics and Outcomes in Children and Young Adults Hospitalized for Clinically Suspected Myocarditis in the Last Ten Years-Data from the MYO-PL Nationwide Database. *J Clin Med*. 2021;10(23):5502. doi: 10.3390/jcm10235502
7. Jasiński M, **Biliński J**, Basak GW. The Role of the Gut Microbiome in Pathogenesis, Biology, and Treatment of Plasma Cell Dyscrasias. *Front Oncol*. 2021;11:741376. doi: 10.3389/fonc.2021.741376
8. Gałązka P, Styczyński J, Czyżewski K, Salamonowicz-Bodzioch M, Frączkiewicz J, Zając-Spychała O, Zaucha-Prażmo A, Goździk J, **Biliński J**, Basak GW. Impact of decontamination therapy on gastrointestinal acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children *Current Research in Translational Medicine* 2021; 69 (3):103298
9. **Bilinski J**, Biernacka EK, Januszewicz A Cardiac amyloidosis secondary to multiple myeloma - successful sequential cardiac and autologous stem cell transplantations with excellent outcome *European Heart Journal* 2021;ehab386 <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab386>
10. **Bilinski J**, Winter K, Jasinski M i wsp. Rapid resolution of COVID-19 after faecal microbiota transplantation *Gut* doi: 10.1136/gutjnl-2021-325010
11. 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>
12. Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, **Biliński J**, Roviello G, Iannone LF, Atzeni A, Sobocki BK, Połom K. Gut Microbiome Modulation and Faecal Microbiota

- Transplantation Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancers* (Basel). 2021;13(18):4665. doi: 10.3390/cancers13184665
13. Karakulska-Prystupiak E, Dwilewicz-Trojaczek J, Drozd-Sokołowska J, Kmin E, Chlebus M, Szczypińska K, Boguradzki P, Tomaszewska A, Mądry K, **Biliński J**, Basak GW, Jędrzejczak WW. Prevalence of hypogammaglobulinemia and its management with subcutaneous immunoglobulin supplementation in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-a single-center analysis. *Ann Hematol.* 2021;100(12):3007-3016. doi: 10.1007/s00277-021-04649-y
  14. Hołowko-Ziółek, J.; Ciężczyk, P.; **Biliński, J.**; Basak, G.W.; Stachowska, E. *What Model of Nutrition Can Be Recommended to People Ending Their Professional Sports Career? An Analysis of the Mediterranean Diet and the CRON Diet in the Context of Former Athletes.* *Nutrients* 2020, 12, 3604
  15. **Jarosław Bilinski**, Karol Lis, Agnieszka Tomaszewska, Aleksandra Pechcinska, Pawel Grzesiowski, Tomasz Dzieciatkowski, Alicja Walesiak, Beata Gierej, Bogna Ziarkiewicz-Wróblewska, Martyna Tyszka, Piotr Kacprzyk, Lidia Chmielewska, Anna Waszczuk-Gajda, Wieslaw Wiktor-Jedrzejczak, Grzegorz W Basak *Eosinophilic gastroenteritis and graft-versus-host disease induced by transmission of Norovirus with fecal microbiota transplant* *Transplant Infectious Diseases* 2020;e13386
  16. Anna Waszczuk-Gajda, David Vesole, Jolanta Małyszko, Artur Jurczyszyn, Tomasz Wróbel, Joanna Drozd-Sokołowska, Piotr Boguradzki, Krzysztof Mądry, Agnieszka Tomaszewska, **Jarosław Biliński**, Maria Król, Longin Niemczyk, Magdalena Olszewska-Szopa, Wieslaw Jedrzejczak, Grzegorz Basak *Real-world prognostic factors in autotransplanted multiple myeloma patients with severe renal impairment: study of the Polish Myeloma Study Group* *Archives of Medical Science* 2020; doi.org/10.5114/aoms.2020.93442
  17. Anna Waszczuk-Gajda, Jolanta Małyszko, David H Vesole, (...) **Jarosław Biliński**, Agnieszka Tomaszewska, Martyna Maciejewska, Elżbieta Urbanowska, Beata Blajer, Małgorzata Król, Maria Król, Hanna Zborowska, Artur Jurczyszyn, Jadwiga Dwilewicz-Trojaczek, Wieslaw W Jedrzejczak, Grzegorz W Basak *Negative impact of borderline creatinine concentration and glomerular filtration rate at baseline on the outcome of multiple myeloma patients treated with autologous stem cell transplantation* *Transplantation Proceedings* 2020; 52(7): 2186-2192
  18. Krzysztof Mądry, Karol Lis, (...) **Jarosław Biliński**, Sebastian Giebel, Tomasz Czerw, Jadwiga Dwilewicz-Trojaczek *Predictive model for infection risk in myelodysplastic*

- syndromes, acute myeloid leukemia and chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine - Azacitidine Infection Risk Model - the Polish Adult Leukemia Group study* –Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia 2019; S2152-2650(18)31510-6
19. Maciej Przybylski, Sylwia Rynans, Anna Waszczuk-Gajda, **Jarosław Biliński**, Grzegorz W. Basak, Wiesław W. Jędrzejczak, Marta Wróblewska, Grażyna Młynarczyk, Tomasz Dzieciatkowski *Sequence typing of human adenoviruses isolated from Polish patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – a single center experience* Hematology 2018; 28:1-6; doi: 10.1080/10245332.2018.1457308
  20. **Jarosław Biliński**, Paweł Grzesiowski, Nikolaj Sorensen, Krzysztof Mądry, Jacek Muszyński, Katarzyna Robak, Marta Wróblewska, Tomasz Dzieciatkowski, Grażyna Dulny, Jadwiga Dwilewicz-Trojaczek, Wiesław Wiktor-Jędrzejczak, Grzegorz W. Basak *Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Blood Disorders Inhibits Gut Colonization with Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study* Clinical Infectious Diseases 2017; 65: 364-370; doi: 10.1093/cid/cix252
  21. Zinaida Peric, Violeta Rezo Vranjes, Nadira Durakovic, Lana Desnica, Ivana Marekovic, Ranka Serventi-Seiwerth, Damir Nemet, **Jarosław Biliński**, Grzegorz Basak, Radovan Vrhovac *Gut colonization by multidrug-resistant gram-negative bacteria is an independent risk factor for development of intestinal acute graft-versus-host disease* Biology of Blood and Marrow Transplantation 2017; 23:1221-1222; doi: 10.1016/j.bbmt.2017.03.025.
  22. Katarzyna Robak, Joanna Zambonelli, **Jarosław Biliński**, Grzegorz W. Basak *Diarrhea after allogeneic stem cell transplantation - beyond graft-versus-host disease* European Journal of Gastroenterology and Hepatology 2017; 29:495-502; doi: 10.1097/MEG.0000000000000833
  23. Maciej Przybylski, Anna Majewska, Tomasz Dzieciatkowski, Partycja Rusicka, Grzegorz W Basak, Barbara Nasilowska-Adamska, **Jarosław Biliński**, Wiesław W Jędrzejczak, Marta Wroblewska, Kazimierz Halaburda, Grażyna Młynarczyk, Agnieszka Tomaszewska *Infections due to alphaherpesviruses in early post-transplant period after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Results of a 5-year survey* Journal of Clinical Virology 2017; 87: 67-72; doi: 10.1016/j.jcv.2016.12.008
  24. **Jarosław Biliński**, Paweł Grzesiowski, Jacek Muszyński, Marta Wróblewska, Krzysztof Mądry, Katarzyna Robak, Tomasz Dzieciatkowski, Wiesław Wiktor-Jędrzejczak, Grzegorz W. Basak. *Fecal microbiota transplantation inhibits multidrug-resistant gut pathogens: preliminary report performed in an immunocompromised host.* Archiwum Immunologie et Therapiae Experimentalis 2016; 22(6):1087-93; doi: 10.1007/s00005-016-0387-9

25. **Jarosław Biliński**, Katarzyna Robak, Zinaida Peric, Halina Marchel, Ewa Karakulska-Prystupiuł, Kazimierz Hałaburda, Patrycja Rusicka, Ewa Swoboda-Kopeć, Marta Wróblewska, Wiesław Wiktor-Jędrzejczak, Grzegorz W. Basak. *Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2016; 64(3):255-8; doi: 10.1016/j.bbmt.2016.02.009
26. **Jarosław Biliński**, Natalia Czyżniejewska, Jacek Budzyński. *Attempt to determine the restrictions of ankle - brachial index and usefulness of elevated ankle - brachial index in patients treated on an internal medicine ward*. *Central European Journal of Medicine* 2014; 9 (2): 325-331

#### **Publikacje bez IF:**

27. Alicja Walesiak, **Jarosław Biliński** *Co ma przeszczepianie szpiku do przeszczepiania stolca? Rola mikrobiomu jelitowego u biorców przeszczepu szpiku* *Gastroenterologia Kliniczna* 2019; 11, 2–10
28. Maciej Przybylski, Tomasz Dzieciatkowski, Anna Żuk-Wasek, Anna Waszczuk-Gajda, **Jarosław Biliński**, Paulina Boczek, Marta Wróblewska *Results comparison of cytomegalovirus viral load in hematological patients using real-time PCR assays designed for LightCycler 2.0 system* *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* 2018; 70: 67-75
29. **Jarosław Biliński**, Grzegorz W. Basak *W poszukiwaniu źródeł – rola flory jelitowej w zdrowiu i chorobie. Część II – mikrobiom jelitowy a stwardnienie rozsiane*. *MS Report* 2015; 4: 19-27
30. **Jarosław Biliński**, Natalia Czyżniejewska, Jacek Budzyński *Charakterystyka pacjentów po 50 roku życia hospitalizowanych w oddziale internistycznym skarżących się na bóle kończyn dolnych* *Geriatrics* 2013; 7:203-210
31. **Jarosław Biliński**, Natalia Czyżniejewska, Jacek Budzyński *Sexual dysfunctions in elderly patients hospitalized on an internal medicine ward*. *Geriatrics* 2014; 2: 73-79

#### **Pokonferencyjne w czasopismach z IF:**

32. Peric Z, Durakovic N, Desnica L, Rezo Vranjes V, Marekovic I, Serventi-Seiwerth R, **Biliński J**, Basak G, Vrhovac R *Gut colonization by multidrug-resistant bacteria is an independent risk factor for development of intestinal acute graft-versus-host disease* *Haematologica* 2017; 102: 1-882



33. **Biliński J**, Grzesiowski P, Sorensen N i wsp. *Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Blood Disorders Inhibits Gut Colonization with Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study* Bone Marrow Transplant 2017; 52: 10-16; doi:10.1038/bmt.2017.131
34. **Biliński J**, Robak K, Peric Z i wsp. *The impact of gut colonization by antibiotic-resistant bacteria on the outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation: a retrospective, single-center study*. Bone Marrow Transplant 2016: 51(S1):S110-S113
35. **Biliński J**, Rusicka P, Marchel H i wsp. *Assessment of bacterial gut colonization prior to allogeneic stem cell transplantation as a tool for prediction of systemic infections during early postHSCT period*. Bone Marrow Transplant 2014: 49:S101-S105

Wybrane prace ukazują przekrój współpracy międzyuczelnianej i międzynarodowej oraz spektrum zainteresowań badawczych.

**W RAMACH WYMIENIONYCH PROJEKTÓW WSPÓLPRACOWAŁEM M. IN. Z NASTĘPUJĄCYMI NAUKOWCAMI Z OŚRODKÓW ZAGRANICZNYCH I INNYCH POLSKICH UCZELNI:**

**Profesor Peter Konturek** - Teaching Hospital of the University of Jena, Jena, Niemcy oraz International Society of Microbiota

**Profesor Marvin Edeas** - Department of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, Université de Paris, Institut Cochin, Paris, France oraz Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France

**Doktor Benjamin Mullish** – Division of Digestive Diseases, Department of Metabolism, Digestion and Reproduction, Faculty of Medicine, Imperial College London, UK

**Profesor Guibin Yang** - Department of Gastroenterology, Aerospace Center Hospital, Peking University Aerospace School of Clinical Medicine, Pekin, Chiny

**Profesor Zinaida Peric** - School of Medicine, University of Zagreb, Zagrzeb, Chorwacja

**Profesor Łukasz Dziewit** – Instytut Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej, Uniwersytet Warszawski

**Profesor Jan Styczyński** – Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Profesor Ewa Stachowska** – Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

**Profesor Karolina Skonieczna – Żydecka** - Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

**Doktor Paweł Grzesiowski** – Instytut Profilaktyki Zakażeń

**Profesor Ewa Małecka-Wojcieszko** – Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Doktor Katarzyna Winter** - Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Profesor Andrzej Januszewicz** – Narodowy Instytut Kardiologii w Warszawie

**Profesor Elżbieta Katarzyna Biernacka** - Narodowy Instytut Kardiologii w Warszawie

**Doktor Kazimierz Hałaburda** – Instytut hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

## **6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ**

### **a. OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE**

W 2019 roku w ramach komercjalizacji nauki prowadzonej w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym powołałem Human Biome Institute – spółkę biotechnologiczną *spin off* WUM prowadzącą działalność badawczo – rozwojową. Spółka wykupiła od WUM prawa własności intelektualnej do 3 projektów prowadzonych w WUM, dzięki czemu uczelnia otrzymała także punkty w ewaluacji nauki z ramienia komercjalizacji badań. Human Biome Institute jest pierwszą w Polsce i jedną z nielicznych w Europie spółką biotechnologiczną pracującą w

obszarze mikrobiomu człowieka oraz twórcą profesjonalnego banku mikrobioty jelitowej z wdrożeniem na rynek produktów zawierających pełne konsorcjum mikrobioty jelitowej do stosowania u ludzi. Preparaty te służą wykonaniu transplantacji mikrobioty jelitowej – transferu mikroorganizmów jelitowych dawcy do przewodu pokarmowego pacjenta w celach leczniczych. Preparaty (w tym innowacja na skalę kraju – kapsułki) zapewniają m. in. ponad 90% wyleczalność nawrotowych zakażeń *C. difficile* (najczęstszej infekcji wewnątrzszpitalnej). Spółka prowadzi ultranowoczesne badania naukowe i rozwojowe mające na celu wprowadzić na rynek Bioterapeutyki Nowej Generacji – leki na bazie mikrobioty jelitowej, o składzie ustalonym dzięki platformie TRAPP MICROBS opartej na sztucznej inteligencji i wyizolowane w ultranowoczesnym laboratorium kulturomiczo – genomicznym QLab. To ultranowoczesne laboratorium badawcze, złożone jest z części *in silico*, czyli maszynarii obliczeniowej i predykcyjnej do analiz wysokoprzepustowych i generowania danych służących do odkrycia nowych leków, bioterapeutyków, procesów, schematów oraz części *in vitro*, którą jest laboratorium kulturomiczo-genomiczne nowej generacji – wyposażone nie tylko w narzędzia do hodowli trudnych mikrobów ale także narzędzia do wysokoprzepustowej analizy genetycznej, fenotypowej, immunologicznej oraz izolacji wskazanych celów. Razem z wytwórnią preparatów do transplantacji mikrobioty jelitowej, całość stanowi uzupełniającą się kompleksową platformę *drug discovery* (MicroDrug), zdolną do radzenia sobie w ekstremalnie trudnych warunkach badawczych i przygotowująca preparaty w najwyższym światowym standardzie.

Spółka prowadzi własne projekty naukowe, w tym granty naukowe (m. in. w konsorcjum z WUM) w obszarze antybiotykooporności, immuno-onkologii, immunomodulacji, longevity/wellbeing, chorób neurodegeneracyjnych i innych. Dynamiczny rozwój naukowy oraz Zespół złożony z wybitnych naukowców pozwala wierzyć iż spółka osiągnie duży sukces globalny.

## **b. DYDAKTYKA**

### **PROWADZENIE ZAJĘĆ DYDAKTYCZNYCH:**

- hematologia dla studentów Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – od 2014 r.
- hematologia dla studentów Oddziału Nauczania w Języku Angielskim (English Division) Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – od 2014 r.

- zajęcia praktyczne w Centrum Symulacji Medycznej dla studentów Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – od 2022 r.

- seminaria dla lekarzy specjalizujących się w transplantologii klinicznej w ramach kursów specjalizacyjnych (CMKP, CKP WUM)

#### **PROMOTOR POMOCNICZY PRACY DOKTORSKIEJ:**

- Wydział Lekarski Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, szkoła doktorska, lek Marcin Jasiński, w trakcie

- Wydział Lekarski Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, szkoła doktorska, lek Dorota Szczeń, w trakcie

#### **PROMOTOR PRACY LICENCJACKIEJ:**

- Wydział Nauk o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, mgr Aleksandra Sławińska, pt. „Wpływ diety dawców mikrobioty jelitowej na parametry uformowania stolca według skali Bristolskiej oraz gęstość i objętość mierzoną ilością powstałych kapsulek w procesie wytwarzania preparatów mikrobioty jelitowej” – obrona 2023 z wyróżnieniem

#### **c. UDZIAŁ W WYBRANYCH KONFERENCJACH (wykłady ustne, sesje posterowe):**

1. Transplantacja mikrobioty jelitowej (FMT) jako metoda redukcji ryzyka okołoprzeszczepowego zakażeń bakteriami wielolekoopornymi - XXII Konferencja Polskiego Towarzystwa Hepatologicznego 25-27 maja 2023, Katowice
2. Jak wykonać przeszczepienie mikrobioty jelitowej – aspekty praktyczne – Warszawskie spotkania Gastroenterologiczne – Warszawa 11-12.06.2022
3. Przeszczep mikroflory przy użyciu kału-najnowsze doniesienia i perspektywy - Nutribiota Szczecin 4.06.2022
4. Fecal microbiota transplantation for GVHD – Transplant Complications Working Party Educational Meeting of the EBMT 18-19 listopad 2021
5. Gut microbiota and graft-versus-host disease in patients after bone marrow transplantation. FMT as a prevention or treatment? Targeting Microbiota by International Society of Microbiota 10-11 October, 2019, Kraków

6. Microbiota and HSCT - 21st Educational Course of the Infectious Diseases Working Party EBMT, 25-27 October 2018 Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
7. The role of gut microbiome in hematology and hematopoietic cell transplantation - XVI conference of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology Warsaw, Poland 8-10 June 2017
8. Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Blood Disorders Inhibits Gut Colonization with Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study – PRESIDENTIAL SYMPOSIUM, 42 EBMT annual meeting, 26-29.03.2017, Marseille, France
9. Fecal microbiota transplantation - "biological weapon" to fight with antibiotic resistance or the way to improve the patient's prognosis? IInd Polish Conference „Microorganisms in the human world - opportunistic organisms Bydgoszcz, Poland 20-21.05.2016
10. Fecal microbiota transplantation other than *C. difficile* infection – own perspective I International Clinical Symposium „CLOSTRIDIUM DIFFICILE infections – pandemy of XXI century” Warsaw, Poland 28.10.2015
11. The world's first fecal microbiota transplantation to eradicate the carriage of antibiotic-resistant bacteria from the gastrointestinal tract in a patient with blood disease – XXVI Conference of Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Szczecin, Poland 23-26.09.2015
12. Biliński J, et al. Fecal microbiota transplantation to treat GVHD – retrospective survey by EBMT. Praga 2022
13. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Bilinski J, Waszczuk-Gajda A, Jedrzejczak WW, Basak GW, Wroblewska M, Mlynarczyk G *The relationship between viral infection and the development of acute graft-versus-host disease on adult recipients of allogeneic haematopoietic stem cells* 27th Annual Meeting of the Society for Virology; 22–25 March 2017; Marburg, Germany
14. Przybylski M, Rynans S, Waszczuk-Gajda A, Bilinski J, Jedrzejczak WW, Basak GW, Mlynarczyk G, Dzieciatkowski T *Sequence typing of human adenoviruses isolated from Polish allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients* 27th Annual Meeting of the Society for Virology; 22–25 March 2017; Marburg, Germany
15. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Basak GW, Bilinski J, Tormanowska M, Tomaszewska A, Halaburda K, Mlynarczyk G. *The potential role of viral infections on appearance of graft-versus-host disease on adult recipients of allogeneic*

- haematopoietic stem cell transplantation in early post-transplant period.* 6<sup>th</sup> European Congress of Virology, 19-22.10.2016 Hamburg, Germany
16. Przybylski M, Tomaszewska A, Dzieciatkowski T, Majewska A, Rusicka P, Basak GW, Nasiłowska-Adamska B, Biliński J, Jędrzejczak WW, Wróblewska M, Młynarczyk G, Hałaburda K *Prevalence of alpha-herpesvirus DNA in the blood of allogeneic hematopoietic stem cells recipients in the early post-transplant period* XXVIII Meeting of Polish Society of Microbiology „Microbiology – new challenges, new perspectives” 25-27.09.2016, Bydgoszcz, Poland
  17. Biliński J, Robak K, Peric Z et al. *The impact of gut colonization by antibiotic-resistant bacteria on the outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation: a retrospective, single-center study.* EBMT, Valencia, Spain 2016 - Submission N<sup>o</sup>: EBMT16-PH-1559
  18. Biliński J, Grzesiowski P, Muszyński J et al. *The world's first fecal microbiota transplantation to eradicate the carriage of antibiotic-resistant bacteria from the gastrointestinal tract in a patient with blood disease –* XXVI Conference of Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Szczecin, Poland 23-26.09.2015
  19. Biliński J, Robak K, Rusicka P i wsp. *Analysis of the influence of gut colonization with antibiotic-resistant bacteria on the results of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation* XXVI Conference of Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Szczecin, Poland 23-26.09.2015
  20. Biliński J, Grzesiowski P, Muszyński J i wsp. *Fecal microbiota transplantation to eradicate the carriage of multi-drug resistant bacteria from the gastrointestinal tract in a patient with cancer and secondary immunodeficiency –* I International Conference „Infections in hematology and transplantology” Kazimierz Dolny, Poland; 7-9.05.2015
  21. Biliński J, Robak K, Rusicka P i wsp. *Analysis of the influence of gut colonization with antibiotic-resistant bacteria on the results of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation -* I International Conference „Infections in hematology and transplantology” Kazimierz Dolny, Poland; 7-9.05.2015
  22. Biliński J, Rusicka P, Marchel H, i wsp. *Assessment of bacterial gut colonization prior to allogeneic stem cell transplantation as a tool for prediction of systemic infections during early postHSCT period.* EBMT annual meeting Milan 2014; Bone Marrow Transplant; 49:S101-S385

23. Biliński J, Czyżniejewska N, Budzyński J *Sexual life disorders in patients hospitalized in the internal medicine department Vth International Conference of Polish Angiology Society; Ustroń, Poland 9.11.2013*
24. Biliński J, Czyżniejewska N, Budzyński J *Ankle-brachial index in patients hospitalized in the internal medicine department Vth International Conference of Polish Angiology Society; Ustroń, Poland 9.11.2013*
25. Biliński J, Czyżniejewska N, Budzyński J *Lower limb pain and ankle-brachial index in patients over 50 years of age hospitalized in the internal medicine department Vth International Conference of Polish Angiology Society; Ustroń, Poland 9.11.2013*

#### **d. AUTORSTWO I ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH NAUKOWYCH**

##### **ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH NAUKOWYCH**

1. **Tytuł rozdziału:** Transplantacja mikrobioty jelitowej

**Tytuł książki:** Żywnienie w zaburzeniach mikrobioty jelitowej

**Adres wydawcy:** Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2021

**Opis fizyczny:** s. 379 - 391

**Rodzaj:** rozdział w monografii naukowej

**Język publikacji:** polski

2. **Tytuł rozdziału:** Diagnostyka limfadenopatii

**Tytuł książki:** Hematologia Kompendium

**Adres wydawcy:** Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2021

**Opis fizyczny:** s. 195 - 200

**Rodzaj:** rozdział w podręczniku

**Język publikacji:** polski

## 7. INNE

### NAGRODY, STYPENDIA I WYRÓŻNIENIA:

#### NAGRODY I WYRÓŻNIENIA:

1. Laureat – III miejsce w Konkursie „Innowator Mazowska – Innowacyjny Naukowiec” – 2020 r.
2. Laureat - Nagroda Zaufania Złoty OTIS w kategorii Debiut naukowy – 2020 r.
3. Laureat – Młody Ambasador (Young Ambassador) Europejskiego Towarzystwa ds. Transplantacji Szpiku i Krwi (EBMT) – 2020 r.
4. Laureat - Nagroda specjalna JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego „Złota kukułka” za pracę z największą liczbą cytowań w danym okresie wśród naukowców WUM – 2019 r.
5. Laureat – nagroda zespołowa Wydziału Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk – 2017 r.
6. Laureat Nagrody III stopnia Rektora WUM 2017 r.
7. III miejsce w klasyfikacji zespołowej w Finale Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Anatomicznej „Scapula Aurea” - 31.05.2008 Warszawski Uniwersytet Medyczny
8. Finalista VI Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej „Superhelisa” 16.05.2009 Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków
9. VI miejsce w Finale II Edycji Ogólnopolskiego konkursu „Przypadki medyczne” 07.05.2011 Wrocław
10. I miejsce w X Jubileuszowej edycji Ogólnopolskiego konkursu diagnostycznego „Sprawa dla diagnosty” 08.06.2012 portal przypadkimedyczne.pl Wrocław
11. I miejsce w XI edycji Ogólnopolskiego konkursu diagnostycznego „Sprawa dla diagnosty” 10-30 listopada 2012 roku za pośrednictwem portalu przypadkimedyczne.pl Wrocław

#### STYPENDIA:

1. **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** za wybitne osiągnięcia w nauce na rok 2012/2013 – przyznane 7.12.2012 w Warszawie
2. Na każdym roku studiów lekarskich **Stypendium Rektora** (dawne stypendium naukowe) za osiągnięcia w nauce



3. Na I i III roku studiów Doktoranckich **Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów**
4. Na I i III roku studiów Doktoranckich **Stypendium Projakościowe**
5. **Nagrody Rektora za osiągnięcia naukowe (kilka razy)**

**FUNKCJA RECENZENTA W CZASOPISMACH NAUKOWYCH Z IMPACT FACTOR ORAZ INSTYTUCJI NAUKOWYCH POLSKICH I ZAGRANICZNYCH:**

1. Austrian Science Fund (FWF)
2. Narodowe Centrum Nauki
3. Experimental Hematology & Oncology Journal
4. Frontiers in Microbiology Journal
5. Warsaw International Medical Congress
6. Wiele innych

**PRACA NA RZECZ SAMORZĄDU LEKARSKIEGO, SPOŁECZNOŚCI LEKARSKIEJ, MEDYCZNEJ I SPOŁECZEŃSTWA W OBSZARZE OCHRONY ZDROWIA:**

2022-2026	Delegat na Krajowy Zjazd Lekarzy
2022-2026	Członek Naczelnej Rady Lekarskiej
2018-2022	Wiceprezes Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie Członek Naczelnej Rady Lekarskiej
2018-2022	Delegat na Krajowy Zjazd Lekarzy
2015-2018	Wiceprzewodniczący Porozumienia Rezydentów Ogólnopolskiego Związku Zawodowego Lekarzy

**WYBRANE UMIEJĘTNOŚCI KLINICZNE:**

- wykonywanie zabiegów biopsji szpiku i trepanobiopsji;
- wykonywanie zabiegów biopsji szpiku dawców szpiku w warunkach bloku operacyjnego;
- transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych auto i allogenicznych;

- „mała chirurgia”, m. in. biopsje skóry, opracowanie wkluc centralnych;
- pełna diagnostyka kliniczna internistyczna, hematologiczna, onkologiczna;
- szkolenie GCP (Good Clinical Practice) wraz z uzyskaniem certyfikatów – ostatnie 2022.

Dr n med. Jarosław Bilirski  
LEKARZ  
Numer PWZ 2961434

*Bilirski*

(podpis wnioskodawcy)