

Akceptuję


**KATEDRA I KLINIKA DERMATOLOGII, WENEROLOGII
I DERMATOLOGII DZIECIĘCEJ**
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
**SAMODZIELNY PUBLICZNY SZPITAL KLINICZNY NR 1
W LUBLINIE**
ul. Staszica 11, 20-081 Lublin, tel/fax : +48 81 532-36-47
klinika.dermatologii@umlub.pl
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Dorota Krasowska

Prof. dr hab. n. med. Dorota Krasowska
Katedra i Klinika Dermatologii,
Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Lublin 31.07. 2023

Recenzja pracy doktorskiej lek. Alberta Steca

**na podstawie cyklu publikacji pt. „Rola zaburzeń bariery jelitowej i metabolitów
bakteryjnych w twardzinie układowej – implikacje kliniczne i terapeutyczne”**

Promotor: Promotor: prof. dr hab. n. med. Lidia Rudnicka

1. **Stec A, Sikora M, Maciejewska M, Paralusz-Stec K, Michalska M, Sikorska E, Rudnicka L.:**
Bacterial Metabolites: a Link between Gut Microbiota and Dermatological Diseases.
International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(4):3494.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043494>

IF 6,208; punkty MEN 140

2. **Stec A, Maciejewska M, Paralusz-Stec K, Michalska M, Giebułtowiec J, Rudnicka L, Sikora M.:**
The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide is Linked to Specific
Complications of Systemic Sclerosis. *Journal of Inflammation Research* 2023;16:1895-1904.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S409489>

IF 4,631; punkty MEN 140

3. **Stec A, Maciejewska M, Zaremba M, Paralusz-Stec K, Michalska M, Rudnicka L, Sikora M.** The Clinical Significance of Serum Biomarkers of the Intestinal Barrier in Systemic Sclerosis: a Cross- Sectional Study. *Journal of Personalized Medicine* 2023; 13(4):678. <https://doi.org/10.3390/jpm13040678>

IF 3,508; punkty MEN 70

Lek.med Albert Stec ukończył studia na Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w 2022 r. Od III-ego roku studiów tj. od 2018 r. aktywnie uczestniczył w działalności koła dermatologicznego w Klinice Dermatologicznej WUM. Działalność w kole zaowocowała powstaniem prac naukowych, które Kandydat prezentował na wielu konferencjach. Warto podkreślić, że wartościowy aspekt poznawczy i merytoryczny prezentowanych doniesień został dostrzeżony, a Kandydat wielokrotnie wyróżniony: zdobył pierwsze miejsce na międzynarodowej konferencji studenckiej WIMC w sesji dermatologicznej w 2019 r., wyróżnienie w konkursie na najlepszą pracę eksperymentalną podczas Zjazdu Sekcji Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w 2019 r., drugie miejsce na międzynarodowej studenckiej konferencji "Interdyscyplinarne aspekty chorób skóry i błon śluzowych" w 2020 r. Był także współautorem prac prezentowanych podczas konferencji międzynarodowych 6th Systemic Sclerosis World E-Congress w 2020 r. i EADV spring symposium w 2021 r. Warto zauważyć, że praca doktorska powstała w ramach realizacji projektu uzyskanego w postępowaniu konkursowym dedykowanym dla studentów „Najlepsi z najlepszych! 4.0.”, Kandydat w ramach tego projektu odbywał także staż w Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie nauczył się obsługi aparatu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (HPLC), podstawowych technik laboratoryjnych i wykonywania testów immunoenzymatycznych. Kandydat jest współautorem ciekawych prac dotyczących zaburzeń bariery jelitowej i metabolitów bakteryjnych w łuszczycy o łącznej punktacji MEN 520 i IF 16,135 co świadczy o szerokich zainteresowaniach naukowych i dużym potencjale naukowym.

Twardzina układowa jest chorobą układową tkanki łącznej, w której zaburzenia morfologii i funkcji naczyń krwionośnych, pobudzenie układu immunologicznego i proces włóknienia skóry i narządów wewnętrznych przyczyniają się do rozwoju choroby. W przebiegu twardziny układowej dochodzi do zajęcia procesem chorobowym wielu narządów i układów, który w efekcie prowadzi do ich niewydolności. Do chwili obecnej patogenеза choroby nie została wyjaśniona i nadal trwają poszukiwania czynników odpowiedzialnych za proces włóknienia. Częstym objawem choroby jest zajęcie przewodu pokarmowego, klinicznie manifestujące się jako zaburzenia przełykania, wzdęcia, biegunki i zaparcia czy objawy związane z SIBO (Zespół rozrostu flory bakteryjnej jelita cieniego). Nieustannie poszukuje się także markerów, które pozwoliłyby na precyzyjną diagnostykę, stratyfikację i wybór najlepszej opcji terapeutycznej dla chorego. W ostatnich latach wykazano, dysbiotyczna flora bakteryjna przewodu pokarmowego i cechy uszkodzenia bariery jelitowej, w tym obecność metabolitów bakteryjnych może mieć wpływ na rozwój wielu chorób m.in. chorób o podłożu autoimmunologicznym. Dlatego koncepcja i przeprowadzone badania przez Doktoranta doskonale wpisują się w badanie metabolitów bakteryjnych i określenie ich znaczenia u chorych na twardzinę układową.

Osiągnięcie naukowe przedstawione do recenzji spełnia warunki określone w Ustawie z dnia z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) art. 187 tejże ustawy i stanowi cykl trzech prac, dwóch oryginalnych i jednej przeglądowej powiązanych tematycznie - „**Rola zaburzeń bariery jelitowej i metabolitów bakteryjnych w twardzinie układowej – implikacje kliniczne i terapeutyczne**”. We wszystkich pracach Kandydat jest pierwszym autorem. Podany cykl publikacji do recenzji **ma wysoki IF: 14,347 ; punkty MEN 350.**

Celem pracy Doktoranta było

1. Określenie potencjalnych nieprawidłowości w stężeniu metabolitu dysbiotycznej mikrobioty jelitowej – N-tlenku trimetyloaminy (ang. trimethylamine N-oxide; TMAO) w twardzinie układowej oraz potencjalnego związku z wystąpieniem typowych objawów narządowych choroby.

2. Ocena stanu bariery jelitowej w twardzinie układowej i określenie związku stężenia markerów przepuszczalności jelit z aktywnością i objawami choroby, w tym w szczególności z występowaniem śródmiąższowej choroby płuc oraz zaburzeniami motoryki przełyku.
3. Analiza potencjalnych różnic w stężeniu markerów przepuszczalności jelit u pacjentów z różnym czasem trwania twardziny układowej.

Pierwsza praca z cyklu (*Stec A et al.: Bacterial Metabolites: a Link between Gut Microbiota and Dermatological Diseases*) jest obszerną pracą przeglądową doskonale wprowadzającą czytelnika w badane zagadnienie. Celem pracy była ocena roli poszczególnych grup metabolitów produkowanych przez bakterie mikrobiomu jelitowego w wybranych chorobach autoimmunologicznych: toczeń rumieniowaty układowy, twardzina układowa, łuszczyca i atopowe zapalenie skóry. W ostatnich latach wykazano, że bakterie jelitowe, oddziałując w modelach różnych osi np.: oś jelita-skóra, oś jelita-mózg mają ogromny wpływ na zachowanie homeostazy ustroju poprzez szczególną zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej, przy czym szczególną rolę przypisuje się metabolitom bakteryjnym wytwarzanym przez mikrobiotę jelitową. Niektóre metabolity mikrobioty jelitowej mogą działać korzystnie na homeostazę (między innymi krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs) i pochodne tryptofanu), a inne negatywnie (pochodne amin czwartorzędowych, tak jak N-tlenek trimetyloaminy (TMAO)). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs)- octan, propionian i maślan powstają w procesie fermentacji nieprzyswajalnych resztek pokarmowych przez bakterie jelitowe. Wykazują one działanie przeciwzapalne i immunomodulujące poprzez zwiększenie populacji limfocytów T regulatorowych oraz hamowanie syntezy cytokin zapalnych. Poprzez korzystny wpływ na proliferację i różnicowanie keratynocytów poprawiają funkcjonowanie bariery skórnej i zmniejszają przelnaskórkową utratę wody (TWEL) co niewątpliwie ma ogromne znaczenie u chorych na atopowe zapalenie skóry. Ważne znaczenie mają także metabolity tryptofanu, powstające w wyniku przekształcenia tryptofanu przez bakterie jelitowe na drodze szlaku indolowego. Metabolity te aktywują receptor węglowodorów aromatycznych (*aryl hydrocarbon receptor (AhR)*), który występuje na wielu komórkach m.in. keratynocytach, melanocytach, fibroblastach, limfocytach, mastocytach, sebocytach, komórkach Langerhansa. Aktywacja receptora AhR w keratynocytach u chorych na AZS zwiększa zawartość filagryny i lorikryny, kluczowych białek, które odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie bariery

skórnej. Aktywacja tego receptora poprawia także gojenie ran i obniża skłonność do tworzenia blizn poprzez zwiększanie poziomu MMP i hamowanie ekspresji kolagenu I i fibronektyny w fibroblastach skóry. Znaczenie tego receptora potwierdzono w praktyce klinicznej, bowiem uzyskano nowy lek tapinarof, będący agonistą receptora AhR, który zakończył badanie kliniczne 3 fazy u chorych na łuszczycę, a obecnie znajduje się w badaniach 3 fazy u chorych na atopowe zapalenie skóry. Kolejne metabolity N-tlenek trimetyloaminy (TMAO) i trimetyloamina (TMA) powstają z dostarczanych z pożywieniem fosfolipidów: choliny, L-karnityny i fosfatydylocholiny w wyniku ich przekształcenia przez mikrobiotę jelitową. Uważa się, że gatunki bakterii jelitowych związane z dysbiozą mają większy potencjał do tworzenia wymienionych metabolitów w porównaniu do eubiotycznej mikrobioty. Wzrost tych metabolitów obserwowano w wielu jednostkach chorobowych takich jak choroby sercowo-naczyniowe, łuszczycowe zapalenie stawów i reumatoidalne zapalenie stawów. TMAO wykazuje wielokierunkowe działanie prozapalne, indukuje wytwarzanie prozapalnych cytokin, takich jak TNF, IL-6 i białko C-reaktywne (CRP) przez komórki układu odpornościowego. W przedstawionej pracy Doktorant dokonał obszernej analizy wymienionych metabolitów w różnych chorobach autoimmunologicznych, zwracając szczególną uwagę na udział tych metabolitów w odpowiedzi immunologicznej zaangażowanej w patogenezie tych chorób.

W dalszej części pracy Doktorant zwraca uwagę na możliwość bezpośredniego i pośredniego modyfikowania mikrobiomu oraz suplementacji korzystnych metabolitów w postaci postbiotyków co może stanowić potencjalną opcję terapeutyczną w wielu zapalnych i autoimmunologicznych chorobach i otwierać nowe możliwości dla personalizowanej terapii. Ta doskonale napisana praca przeglądowa, w oparciu o analizę 192 pozycji głównie najnowszego anglojęzycznego piśmiennictwa bardzo dobrze wprowadza czytelnika w badane zagadnienia roli zaburzeń bariery jelitowej i metabolitów w twardzinie układowej i doczekała się już cytowania w literaturze.

Celem drugiej pracy z cyklu (*Stec A, et al.: The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide is Linked to Specific Complications of Systemic Sclerosis*) była ocena stężenia i korelacji klinicznej metabolitu N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) uwalnianego przez bakterie jelitowe u 63 chorych na twardzinę układową w porównaniu do 47 zdrowych osób dobranych pod względem płci i wieku. Poziom TMAO w osoczu został oznaczony z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (HPLC-MS). Otrzymane wyniki opracowano przy pomocy programu Statistica 13.3. Zgodność

rozkładu rozkładu normalnego oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Porównanie zmiennych jakościowych przeprowadzono wykorzystując test chi-kwadrat (z poprawką Yatesa dla grup $n < 10$). Test t-Studenta wykorzystano do oceny zmiennych ciągłych o rozkładzie normalnym, natomiast test U Manna-Whitney'a do oceny zmiennych ciągłych o rozkładzie różnym od rozkładu normalnego. Korelację między zmiennymi określono przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana. Uzyskano niezmiernie ciekawe wyniki, Doktorant wykazał, że pacjenci z twardziną układową mają istotnie wyższe stężenie TMAO w osoczu w porównaniu do osób w grupie kontrolnej (283,0 ng/ml (IQR 188,5-367,5) vs. 205,5 ng/ml (IQR 101,0-318,0); $p < 0,01$). Dodatkowo wykazał, że pacjenci z twardziną i śródmiąższową chorobą płuc (ILD) cechują się wyższym stężeniem TMAO w osoczu w porównaniu do pacjentów bez ILD (302,0 ng/ml (IQR 212,0-385,5) vs. 204,0 ng/ml (IQR 135,5-292,0); $p < 0,01$). Doktorant także wykazał istotną ujemną korelację stężeń TMAO z oznaczoną zdolnością dyfuzyjną płuc dla tlenu węgla (DLCO), ($\rho = -0,53$; $p = 0,013$). Stężenie TMAO było wyższe w grupie pacjentów z zaburzeniami motoryki przełyku (289,75 ng/ml (IQR 213,75-387,5) vs. 209,5 ng/ml (IQR 141,5-315,0); $p = 0,026$). Ponadto obserwowano istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem TMAO w osoczu a frakcją wyrzutową lewej komory serca (left ventricle ejection fraction; LVEF): $\rho = -0,39$; $p = 0,009$ oraz dodatnią korelację pomiędzy stężeniem TMAO a stężeniem N-końcowego fragmentu propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP): $\rho = 0,41$; $p = 0,0009$. Poziom TMAO u pacjentów wykazywał też dodatnią korelację z wynikiem w skali Scleroderma Clinical Trials Consortium Damage Index (SCTC-DI): $\rho = 0,78$; $p < 0,001$. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant sugeruje, że TMAO może stanowić wartościowy marker uszkodzenia narządowego w twardzinie układowej. Obserwowane zwiększenie stężenia TMAO u chorych z zajęciem płuc, przełyku i dodatnia korelacja stężenia metabolitu z markerami zajęcia serca mogą świadczyć o potencjalnej roli mikrobioty jelitowej i jej metabolitów w patogenezie swoistych objawów narządowych choroby. Wnioskuje bardzo ostrożnie zauważa bowiem, że badania wymagają potwierdzenia w przyszłych badaniach prospektywnych, niemniej jednak sugeruje możliwość wykorzystania TMAO jako markera ogólnego postępu choroby, co mogłoby przyczynić się do lepszej stratyfikacji chorych i tym samym optymalizacji terapii. Warto zauważyć, że przeprowadzone badania markerów uszkodzenia bariery jelitowej są pionierskie i stanowią nowatorskie osiągnięcia lek. Alberta Steca.

Celem badań trzeciej publikacji (*Stec A et al.: The Clinical Significance of Serum Biomarkers of the Intestinal Barrier in Systemic Sclerosis: a Cross-Sectional Study*) była ocena

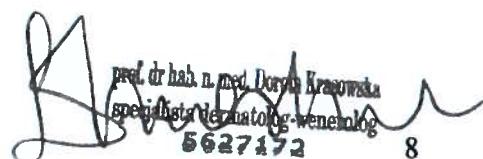
potencjalnych różnic w przepuszczalności bariery jelitowej u chorych na twardzinę układową w porównaniu z grupą kontrolną oraz zbadanie zależności pomiędzy badanymi wskaźnikami przepuszczalności jelit a objawami narządowymi twardziny układowej. W surowicy 50 chorych na twardzinę układową i 30 osób grupy kontrolnej dopasowanych pod względem wieku, płci i wskaźnika BMI oceniono stężenie wybranych markerów przepuszczalności bariery jelitowej, jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe (I-FABP), kładyny-3 i lipopolisacharydów bakteryjnych (LPS). Oznaczenia wykonano metodą immunoenzymatyczną. Wyniki opracowano przy użyciu oprogramowania Statistica 13.3. z zastosowaniem standardowych testów zarówno dla rozkładu normalnego i różnego od normalnego oraz standardowych współczynników korelacji. U chorych na twardzinę układową Kandydat wykazał wyższe stężenie LPS w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną (232,30 pg/mL (IQR 149,00–347,70) vs. 161,00 pg/mL (IQR 83,92–252,20); $p < 0,05$). Warto zauważyć, że chorzy z krótszym czasem trwania twardziny układowej (≤ 6 lat) mieli wyższe stężenie LPS (280,75 pg/mL (IQR 167,30–403,40) vs. 186,00 pg/mL (IQR 98,12–275,90); $p < 0,05$) i kładyny-3 (16,99 ng/ml (IQR 12,41–39,59) vs. 13,54 ng/ml (IQR 10,29–15,47); $p < 0,05$) w porównaniu z pacjentami z dłuższym czasem trwania choroby (powyżej 6 lat). Co ciekawe w grupie pacjentów z krótszym czasem trwania choroby obserwowano istotnie wyższe stężenie LPS w surowicy u chorych ze współistniejącą chorobą śródmiąższową płuc w porównaniu do pacjentów bez zajęcia płuc (385,55 pg/mL (IQR 266,90–506,50) vs. 217,75 pg/mL (IQR 157,25–280,75); $p < 0,05$). Dodatkowo pacjenci z zaburzeniami motoryki przełyku charakteryzowali się niższym poziomem LPS w porównaniu do pacjentów z prawidłowym wynikiem badania kontrastowego przełyku (188,05 pg/ml (IQR 102,31–264,40) vs. 283,95 pg/ml (IQR 203,20–356,30); $p < 0,05$).

Otrzymane przez Doktoranta wyniki wskazują na uszkodzenie bariery jelitowej u chorych na twardzinę układową, szczególnie w pierwszych latach choroby gdzie lipopolisacharydy bakteryjne przekraczają barierę jelitową. Obecny we krwi chorych LPS był związany z zajęciem narządów wewnętrznych- śródmiąższową chorobą płuc. W badaniach *in vitro* wykazano, że LPS może stymulować geny macierzy zewnątrzkomórkowej, szczególnie kolagenu w fibroblastach skóry i zwiększać ich zdolność do wywoływania procesu włóknienia w obecności TGF-beta1. Co więcej LPS może wzbudzać przemianę fibroblastów skóry w miofibroblasty odpowiedzialne za proces włóknienia narządów wewnętrznych. Dodatkowo w modelu mysim choroby zaobserwowano, że podanie myszom LPS nasilało objawy ILD. Co ciekawe monocyty chorych ze współistniejącą ILD po stymulacji LPS wydzielaly duże ilości IL-6, która to odpowiadała za obecne włóknienie skóry i progresję ILD. Warto zauważyć, że

zrozumienie mechanizmów w jaki sposób dysbiotyczna flora jelitowa i uszkodzona bariera jelitowa mogą wpływać na przebieg twardziny układowej wydaje się niezmiernie cenne, szczególnie w praktyce klinicznej. Być może w przyszłości oznaczanie markerów uszkodzenia bariery jelitowej pozwoli na stratyfikację i ocenę prognostyczną pacjentów i pozwoli wybrać dla nich najlepszą opcję terapeutyczną, szczególnie we wczesnej fazie choroby.

Przedłożona do recenzji praca składająca się z cyklu trzech prac powiązanych tematycznie, opublikowanych w recenzowanych czasopismach z wysokim IF i wysoką punktacją MEN doskonale wpisuje się w aktualny nurt badawczy dotyczący twardziny układowej, stanowi oryginalny i nowatorski wkład w obszarze badań dotyczących uszkodzenia bariery jelitowej i jej wpływu na obecność zmian narządowych. Całość stanowi ciekawy i aktualny stan wiedzy dotyczący możliwości wykorzystania markerów uszkodzenia bariery jelitowej w diagnozowaniu, prognozowaniu i zastosowaniu odpowiedniej terapii. Doktorant wyczerpująco odpowiedział na postawione cele, zachował przy tym ostrożne wnioskowanie, co wskazuje na duże doświadczenie naukowe. Prace są napisane ładnym językiem, a doświadczenia wykonano z zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych. Spis pozycji piśmiennictwa w cyklu publikacji liczy 283, głównie anglojęzycznego opublikowanego w ostatnich latach nie budzi zastrzeżeń, a sposób cytowania odbywa się na ogólnie przyjętych zasadach.

Podsumowując, rozprawę doktorską lek. Alberta Steca oceniam bardzo dobrze. Kandydat udowodnił, że potrafi doskonale zaplanować pracę, sformułować cele badawcze, prawidłowo wykonać oznaczenia laboratoryjne i obliczenia statystyczne, ostrożnie wnioskować, a także opublikować uzyskane wyniki badań w recenzowanych czasopismach medycznych. Całość pracy świadczy o dużej dojrzałości naukowej Kandydata na kształtowanie której niewątpliwie miała Pani Promotor prof. Lidia Rudnicka, która jest niekwestionowanym ekspertem w obszarze twardziny układowej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r. poz. 1668) o stopniach naukowych i tytule naukowym w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, habilitacyjnym i o nadanie tytułu profesora. W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie ds. Stopni i Tytułu Naukowego Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Lek. Alberta Steca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. n. med. Dorota Krasowska
specjalista dermatolog-wenerolog
5627172 8