

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. med. Kingi Jaworskiej na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne, pt. *"Przepuszczalność bariery jelito-krew jako marker zaburzeń ogólnoustrojowych"*. Praca została wykonana w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Promotora Prof. dr hab. Marcina Ufnala.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Kingi Jaworskiej jest kompilacją 4 prac naukowo-badawczych wykonanych w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Promotora Prof. Marcina Ufnala. Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi monotematyczny cykl 4 oryginalnych prac, których zasadnicze cele oraz przybliżenie wyników i dyskusja, są przedstawione jasnym i zrozumiałym językiem, całość jest starannie przygotowana pod względem naukowym oraz graficznym w oparciu o aktualne piśmiennictwo zwłaszcza zagranicznych autorów, odpowiadające zagadnieniom stanowiącym treść rozprawy. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich pracach, co świadczy o nabytym już dużym doświadczeniu zarówno w wykonaniu pracy badawczych, jak i edycji poszczególnych manuskryptów, gdzie udział Kandydatki jest główny i dominujący. Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF, Impact Factor) czasopism, w których prace zostały opublikowane wynosi 11,209, natomiast suma punktów wg listy ministerialnej MNiSW z 2019 roku to 380.

Wszystkie prace stanowią spójną całość, jako cykl monotematyczny i odnoszą się do fizjologicznego pojęcia, jakim jest bariera jelito-krew. Szeroko rozumiana bariera przewód pokarmowy-krew krążąca, pełni niezwykle istotną rolę w procesie wchłaniania substancji odżywczych, zwłaszcza w odcinku jelitowym, zapobiegając w normalnych warunkach przenikaniu szkodliwych substancji, jak również bakterii i ich produktów ze światła jelita do krwi. Rozprawa doktorska jest nowoczesna, gdyż pośrednio dotyczy również najnowszych trendów w badaniach przewodu pokarmowego zmierzających do wyjaśnienia roli i znaczenia mikrobioty jelitowej dla fizjologii jelita i całego ustroju. Z badań przeprowadzonych wcześniej wiadomo, bowiem, że uszkodzenie bariery jelito-krew występuje również w dysfunkcji szeregu układów homeostatycznych, w tym np. układu krążenia, czy układu endokrynnego, jak również może towarzyszyć chorobom metabolicznym, np. otyłości, czy nadciśnieniu tętniczemu. Pojawienie się stanów endotoksemii czy upośledzenia perfuzji jelit

w wyniku zmian hemodynamicznych lub *stricte* naczyniowych, może prowadzić do zaburzeń w obrębie funkcjonowania bariery jelito-krew i translokacji jelitowej samych bakterii lub ich produktów metabolicznych do krwiobiegu, co przyjęto określać mianem „*leaky gut*” i ta zwiększona przepuszczalność doprowadza do dalszej destrukcji morfologicznej tej bariery oraz zmian hemodynamicznych w obrębie mikrokrążenia trzewnego, a w konsekwencji zmian w krążeniu systemowym.

Mając powyższe aspekty, już po części umocowane w literaturze medycznej na uwadze, Doktorantka postanowiła dokonać oceny zmian w przepuszczalności bariery jelito-krew, którymi były inwazyjne biomarkery w postaci metabolitów bakterii jelitowych i badania z tego zakresu opublikowano w publikacji nr. 1. Kolejnym celem pracy było opracowanie nieinwazyjnej metody badania bariery jelito-krew w zwierzęcym modelu zapalenia jelit oraz próba zastosowania skuteczności tej metody u pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit (NZJ), co stanowi treść publikacji nr. 2. W skład kompilacji wchodzi też zaplanowane w celach pracy doktorskiej badania Autorki na modelu zwierzęcym, w których oceniano zmiany wspomnianej przepuszczalności bariery jelito-krew dla metabolitów bakteryjnych w zależności od nadciśnienia tętniczego oraz od wieku osobniczego, odpowiednio opublikowanych w publikacjach nr. 3 i 4. W pierwszej kolejności, Doktorantka zrealizowała postawione cele poprzez stworzenie powtarzalnej metodyki dla oceny przepuszczalności bariery jelito-krew, która nie wymaga podawania substancji egzogennych i jest niezależna od czynników takich jak dieta. W tym celu Doktorantka wybrała metyloaminy w tym trimetyloaminę (TMA), która jest metabolitem bakterii jelitowych, oraz pomiar krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), których stężenie mierzono w surowicy krwi. Recenzent zauważa, że te badania wpisują się w najbardziej współczesne trendy nauki, zmierzające do określenia znaczenia m.in. produktów bakterii probiotycznych, takich jak SCFA, w tym np. maślanu, produkowanego przez bakterie jelitowe. Stosując pomiar stosunku stężenia metabolitów we krwi do stężenia w kale pobranego od tych zwierząt Doktorantka wyznaczyła stopień przepuszczalności jelit przy użyciu metabolitów bakteryjnych w modelu doświadczalnym, u szczurów. Z wielkim szacunkiem należy podkreślić fakt, że Doktorantce wraz z zespołem udało się przeprowadzić translację tych badań doświadczalnych do kliniki, wykonując podobne pomiary u pacjentów pediatrycznych z nieswoistymi zapaleniami błony śluzowej jelita. Działanie metody zarówno w warunkach eksperymentalnych jak i klinicznych potwierdził wzrost przepuszczalności bariery dla metabolitów bakteryjnych (w tym dla wspomnianych SCFA) w porównaniu do zdrowych grup kontrolnych. Dodatkowo,

zmiany te były dodatnio skorelowane ze standardowo wykorzystywanymi markerami funkcji jelita, tj. dekstranem znakowanym fluorescencyjnie i kalprotektyną. Badanie Doktorantki wykazały, że możliwym jest pomiar stężenia tych metabolitów bakteryjnych w kale i porównanie tych wartości ze stężeniami tych metabolitów w surowicy krwi, co stanowi oryginalny wkład Doktorantki dla postępu we wspomnianej dziedzinie wiedzy, jakim jest przewód pokarmowy i układ krążenia. Co więcej, badanie jest pozbawione skutków ubocznych i nie pozostaje na etapie obecnych badań, jak stwierdziła Doktorantka, w bezpośrednim związku z rodzajem diety i składu flory bakteryjnej.

Autorka dokonała analizy porównawczej przepuszczalności dla TMA u dwóch szczepów szczurów *Sprague Dawley* i *Wistar Kyoto*, tych ostatnich również w warunkach nadciśnienia tętniczego bez i po leczeniu enalapilem, który jest inhibitorem konwertazy angiotensyny oraz oceniała zmiany morfologiczne, jakie zachodzą w jelicie wraz z wiekiem u poszczególnych szczepów szczurów. Zarówno szczury z nadciśnieniem tętniczym jak i szczury wiekowo starsze, wykazały zwiększoną przepuszczalność okrężnicy dla TMA, czemu towarzyszyły zmiany morfologiczne i hemodynamiczne w okrężnicy (w cyklu prac Doktorantki - publikacja nr 3 i 4). Szczury pojęne enalapilem wykazały poprawę w zakresie zmian patologicznych w okrężnicy indukowanych nadciśnieniem tętniczym. W związku z tym, zasadną jest w mojej opinii konkluzja, że bariera jelito-krew jest potencjalnym punktem uchwytu terapii inhibitorami konwertazy angiotensyny. Wspomniana analiza została wsparta badaniem histopatologicznym błony śluzowej jelita, o czym świadczą dobrze technicznie wykonane obrazy struktury jelitowej zarówno samych enterocytów jak i podścieliska naczyniowego.

W podsumowaniu, Autorka dowiodła, że ocena stężeń metabolitów bakteryjnych może świadczyć o zmianach funkcjonalnych bariery jelito-krew. Ponadto wykazała, że szczury z nadciśnieniem tętniczym wykazują zwiększoną przepuszczalność okrężnicy dla TMA, czemu towarzyszą zmiany morfologiczne i hemodynamiczne w okrężnicy, co może przyczyniać się do pojawieniu się tych markerów we krwi u chorych z zaburzeniami krążenia, a wręcz rokować w kierunku patologicznych zmian w układzie sercowo-naczyniowym.

Wśród drobnych uwag krytycznych z racji Recenzenta tego przewodu, pragnę zwrócić uwagę na fakt, że skład mikrobioty jelitowej może wpływać na przepuszczalność błony śluzowej jelita i dlatego sądzę, że skład mikrobioty i zmiany zasiedlania jelita przez florę czy to

patogenną, czy probiotyczną, stanowi w istotnej mierze o przepuszczalności jelitowej i może w warunkach patologicznych wpływać na różnice stężeń metabolitów w kale i w krwi. Jest, więc kontrowersyjnym stwierdzenie Doktorantki, że stężenie metabolitów przepuszczanych przez jelito do krwi nie zależało od mikroflory jelitowej. Aby to potwierdzić lub temu zaprzeczyć, należałoby wykonać badanie mikrobiomu bakterii, chociażby w modelu zwierzęcym, a zwłaszcza w badaniach u ludzi z NZJ. Uwagę tę, a właściwie zachętę do dalszych badań z tego zakresu pozostawiam w kategorii dyskusji w Doktorantką i ta sugestia będzie być może przyczynkiem i zachętą do dalszych badań w tym zakresie, która w obecnej chwili w żaden sposób nie obniża wartości tej rozprawy. Rozszerzenia wymagają też badania będące wynikiem obserwacji w tej pracy doktorskiej, że choroby układu sercowo-naczyniowego, takie jak nadciśnienie tętnicze, mogą charakteryzować się zwiększoną przepuszczalnością bariery jelito-krew dla metabolitów bakteryjnych, szczególnie u pacjentów wiekowych w chorobami zapalnymi jelit, w przyszłości jeszcze mocniej wyeksponowanych i prowadzonych przez Autorkę i zespół Prof. Marcina Ufnala zapewne przy współpracy z klinikami specjalistycznymi.

W mojej opinii badania Kandydatki przedstawione w postaci kompilacji 4 publikacji połączonych tematycznie, stanowi logiczny ciąg badań poczynawszy od pracy metodycznej i badań na modelu zwierzęcym - po sprawdzenie skuteczności tej metody u pacjentów z NZJ. Badania te wnoszą istotny wkład w poznanie i rozumienie parametrów bariery jelito-krew i co więcej cechuje wyniki uzyskane w toku tych prac już opublikowanych, możliwość translacji do kliniki, dlatego pozwalam sobie zaproponować Panu Przewodniczącemu Rady Dyscypliny Nauk Medycznych i Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych WUM, wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Przeto w konkluzji stwierdzam, że praca Pani lekarz medycyny Kingi Jaworskiej spełnia wszystkie kryteria określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. zawarte w Prawie o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) stawiane kandydatom na stopień doktora nauk medycznych i zwracam się do Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Medycznych i Szanownych Członków Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM z wnioskiem o dopuszczenie Pani Kingi Jaworskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

K I E R O W N I K
Katedry Fizjologii UJ CM

Kraków, dn. 23 października 2020 r.

Prof. zw. dr hab. n. med. Tomasz Brzozowski