

dr hab. n. med. Agata Mulak, prof. UMW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA GASTROENTEROLOGII
I HEPATOLOGII
KLINIKA GASTROENTEROLOGII
I HEPATOLOGII
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
tel. 71 733 21 20, faks: 71 733 21 29

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Kingi Jaworskiej pt. „Przepuszczalność bariery jelito-krew jako marker zaburzeń ogólnoustrojowych”

Badania, których wyniki przedstawiono w przedłożonej do recenzji rozprawie doktorskiej zostały wykonane pod kierownictwem naukowym prof. dr. hab. n. med. Marcina Ufnala, kierownika Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania te zostały zrealizowane w ramach kierowanego przez Doktorantkę projektu: Diamentowy Grant (nr DI2017 009247) pt. „Bariera jelito-krew jako nowy marker oraz cel terapii w nadciśnieniu tętniczym, niewydolności serca i cukrzycy”.

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy funkcjonowania bariery jelitowej oraz oceny zaburzeń jej przepuszczalności w przebiegu schorzeń ogólnoustrojowych. Uwzględniając fakt, że jelita stanowią największą powierzchnię kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym, prawidłowe funkcjonowanie bariery jelitowej odgrywa kluczową rolę w regulacji homeostazy organizmu. Dzięki złożonej strukturze bariera jelitowa spełnia funkcje absorpcyjne, ochronne oraz immunologiczne. Przepuszczalność jest funkcjonalną cechą bariery jelitowej, jednak w przypadku jej zaburzeń może dojść do rozwoju zespołu jelita przesiąkliwego (z ang. *leaky gut syndrome*), czyli zespołu objawów ze strony układu pokarmowego, jak i objawów ogólnoustrojowych, wywołanych przez przedostające się do krwiobiegu przez nieszczelną barierę jelitową produkty przemiany materii, toksyny lub antygeny bakteryjne. W regulacji funkcji bariery jelito-krew uczestniczy szereg czynników wewnątrz- i zewnątrzpochodnych, a wśród nich mikrobiota jelitowa, czynniki dietetyczne, toksyny, stres czy zaburzenia perfuzji jelitowej. W ocenie przepuszczalności bariery jelitowej stosowane są testy wchłaniania cukrów, markery integralności bariery jelitowej, markery stanu zapalnego oraz markery bakteryjne, jednak ich zastosowanie w praktyce klinicznej ma wiele ograniczeń. Zatem badania podjęte przez Doktorantkę wpisują się w bardzo aktualny nurt prac badawczych, w szczególności uwzględniając rolę mikrobioty jelitowej i jej metabolitów w regulacji czynności bariery jelito-krew.

Przedstawiona rozprawa doktorska obejmuje jednotematyczny cykl czterech prac oryginalnych opublikowanych w renomowanych czasopismach. Łączna liczba punktów MNiSW wg listy z 2019 r. wynosi 380, a Impact Factor – 11,209. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich czterech pracach.

Rozprawa doktorska zawiera zwięzłe i treściwe streszczenie oraz przejrzyste napisany wstęp uzasadniający ujęcie wskazanych publikacji w jeden spójny cykl. Po przedstawieniu założeń i hipotezy badawczej Doktorantka jasno sformułowała cztery szczegółowe cele badawcze, których sukcesywna realizacja została przedstawiona w kolejnych publikacjach. Zasadniczym celem pracy było opracowanie nowej metodyki oceny funkcji bariery jelito-krew, a następnie określenie jej przydatności w modelach zwierzęcych i w warunkach klinicznych.

Publikacja nr 1 (*Journal of Visualized Experiments* 2018) przedstawia wyniki pionierskich badań *in vivo*, na podstawie których opracowano nową metodę oceny przepuszczalności bariery jelito-krew u szczurów przy użyciu metabolitów bakteryjnych. Po wprowadzeniu cewników naczyniowych do żyły wrotnej i żyły głównej dolnej badano próbki krwi przed i po podaniu znacznika w postaci trimetyloaminy (TMA) do światła jelita. Na tej podstawie oceniano wchłanianie i klirens wątrobowy znacznika. Szczegółowy opis procedur wraz z filmem instruktażowym stanowi integralną część publikacji zawartej na stronie internetowej czasopisma. Na uwagę zasługuje duży potencjał badawczy opracowanej metody związany nie tylko z możliwością oceny zmian funkcjonalnych bariery jelito-krew, ale także z możliwością oceny wchłaniania i metabolizmu wątrobowego leków czy oceny ciśnienia w żyłę wrotnej.

Druga praca z cyklu (*Experimental Physiology* 2019) przedstawia wyniki badań, na podstawie których opracowano nową nieinwazyjną metodę oceny przepuszczalności bariery jelitowej. Oparta jest ona na określeniu stosunku stężenia metabolitów bakteryjnych we krwi do ich stężenia w kale. W związku z tym, że jest to metoda bezpieczna (bez konieczności podawania substancji egzogennej) i niezależna od czynników zmiennych osobniczo, takich jak dieta czy skład mikrobioty, ma ona duży potencjał kliniczny. Po opracowaniu metody na zwierzęcym modelu zapalenia jelita, badacze potwierdzili jej użyteczność w warunkach klinicznych u pacjentów pediatrycznych z nieswoistym zapaleniem jelit. Dodatkową weryfikacją opracowanej metody było wykazanie korelacji pomiędzy wzrostem przepuszczalności bariery jelito-krew dla krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych z wartościami innych dotychczas stosowanych markerów funkcji tej bariery w postaci stężenia dekstranu znakowanego fluoresceiną w warunkach eksperymentalnych oraz kalprotektyny w stolcu jako markera aktywacji układu immunologicznego jelita w warunkach klinicznych. Ciekawą byłaby także ocena korelacji uzyskanych wyników ze stężeniem zonuliny będącej markerem integralności bariery jelitowej. Odzwierciedleniem

dużego zainteresowania jakie wzbudziła ta praca na forum międzynarodowym jest jej prestiżowe wyróżnienie przez Brytyjskie Towarzystwo Fizjologiczne (*The Physiology Society*), które szeroko rozpropagowało wyniki badań na portalach naukowych, m.in. za pośrednictwem specjalnie przygotowanej animacji.

W kolejnym etapie prac doświadczalnych Doktorantka podjęła się oceny funkcji bariery jelito-krew w zwierzęcym modelu nadciśnienia tętniczego. Wykazano, że szczury z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do szczurów normotensyjnych charakteryzują się zwiększoną przepuszczalnością bariery jelitowej dla TMA oraz towarzyszącymi zmianami morfologicznymi i hemodynamicznymi w zakresie okrężnicy. Pomimo iż związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy chorobami układu krążenia, zaburzeniami przepływu jelitowego, dysfunkcją bariery jelitowej i zwiększonym stężeniem metabolitów bakteryjnych we krwi pozostaje nie w pełni wyjaśniony, przedstawione w publikacji nr 3 wyniki (*PLOS ONE* 2017) wskazują, że wzrost stężenia tlenu trimetyloaminy (TMAO), który pozytywnie koreluje ze wzrostem ryzyka sercowo-naczyniowego, może częściowo wynikać ze zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej dla TMA jako prekursora TMAO. Istotnym aspektem przeprowadzonych badań było także potwierdzenie terapeutycznego efektu enalaprylu – inhibitora konwertazy angiotensyny (ACE), w zakresie morfologicznych i czynnościowych zmian w okrężnicy indukowanych nadciśnieniem tętniczym. Na tej podstawie badacze sformułowali wniosek, iż bariera jelito-krew jest potencjalnym punktem uchwytu terapii inhibitorami ACE. Wniosek ten jest spójny z obserwacją dotyczącą wysokiej ekspresji receptora ACE2 w zakresie jelit, na co zwrócono także uwagę w kontekście objawów jelitowych w przebiegu infekcji wirusem SARS-CoV-2 (wirus wykorzystuje ten receptor do wnikięcia do komórek gospodarza).

W publikacji nr 4 (*Journals of Gerontology: Series A* 2019) wykorzystując opracowaną metodę wykazano w modelu u szczurów wyraźny wpływ wieku na wzrost przepuszczalności bariery jelito-krew dla TMA z towarzyszącymi zmianami morfologicznymi i hemodynamicznymi w jelitach. Tak więc wzrost ryzyka sercowo-naczyniowego wraz z wiekiem może wiązać się ze wzrostem stężenia toksycznych metabolitów bakteryjnych w osoczu z powodu uszkodzenia jelit. Ponadto na podstawie wyników badań *in vitro* zasugerowano, iż główny efekt cytotoksyczny wywiera TMA, a nie jak dotychczas sądzono TMAO. U badanych szczurów stwierdzono także istotne zmiany składu mikrobioty jelitowej zależne od wieku. Dysbioza jelitowa związana z aktywacją układu immunologicznego błony śluzowej jelit i zwiększoną przepuszczalnością bariery jelitowej wydaje się być kluczowym ogniwem w zaburzeniach homeostazy organizmu i wspólnym czynnikiem patogenetycznym nie tylko schorzeń układu pokarmowego, ale także wielu chorób ogólnoustrojowych. Z kolei metabolity bakteryjne jako substancje biologicznie czynne uczestniczą w regulacji wielu procesów

fizjologicznych wywierając niejednokrotnie przeciwstawne działanie. Przykładem mogą być krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które z jednej strony wywierają efekt neuroprotektoryjny i przeciwzapalny, z drugiej zaś strony potwierdzono ich udział w procesach neurodegeneracyjnych, m.in. w przebiegu choroby Parkinsona (Sampson et al. *Cell* 2016).

Zawarte w rozprawie podsumowanie jasno przedstawia najważniejsze wyniki i wnioski, które potwierdziły hipotezę badawczą, że zaburzenia przepuszczalności bariery jelito-krew oceniane za pomocą opracowanej metody na podstawie stosunku stężeń metabolitów bakteryjnych we krwi i w stolcu mogą być markerem zaburzeń ogólnoustrojowych, jak i zmian związanych z wiekiem. Pionierski charakter przeprowadzonych badań i szereg nowych obserwacji stanowi o dużej wartości poznawczej dorobku Doktorantki. Na szczególną uwagę zasługuje także istotne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników w kontekście ich implikacji diagnostyczno-terapeutycznych. Opracowana metodyka oceny przepuszczalności bariery jelito-krew może być stosowana w diagnostyce i monitorowaniu wielu schorzeń związanych z zespołem nieszczelnego jelita. Ze względu na kluczowe znaczenie zaburzeń funkcjonowania bariery jelitowej oraz roli metabolitów bakteryjnych w patogenezie szerokiego spektrum chorób szczególnie interesująca wydaje się możliwość odniesienia wyników przedstawionych badań do schorzeń innych układów, z uwzględnieniem chorób metabolicznych czy neurodegeneracyjnych. Uzyskane rezultaty wskazują również na nowe cele terapeutyczne związane z poprawą funkcjonowania bariery jelito-krew oraz modyfikacją mikrobioty jelitowej.

Po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawioną rozprawą doktorską lek. Kingi Jaworskiej stwierdzam, że nie wnoszę uwag krytycznych. Precyzyjnie zaplanowane cele i sposób ich realizacji wskazują na duże doświadczenie badawcze Doktorantki, a publikacja wyników przeprowadzonych badań w renomowanych czasopismach zagranicznych potwierdza ich wartość merytoryczną.

Oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668), wnoszę zatem o dopuszczenie jej Autorki – lek. Kingi Jaworskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie uwzględniając wartość merytoryczną oraz nowatorski charakter publikacji ujętych w cyklu składam wniosek o wyróżnienie przedłożonej pracy.

Agata Mulak

Wrocław, 7 września 2020 r.

dr hab. n. med. Agata Mulak, prof. UMW