



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/8749/2023 P
Data:2023-06-01

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	02 -06- 2023
L. dz. RN-BM/	837

Wrocław, dnia 23.05.2023 r.

VIDI:

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
Przewodniczący

prof. dr hab. Agnieszka Hałoń

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Kamila Litwinowicza

**pt. „Ocena produktów zaawansowanej glikacji
i mikrobiomu u pacjentów nadużywających alkoholu”**

wykonanej w

Katedrze Biochemii i Immunochemii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

pod opieką

Promotora Prof. dr hab. Andrzeja Gamiana



OCENA METODOLOGICZNA I FORMALNA PRACY

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji dysertacja lek. Kamila Litwinowicza zatytułowana „Ocena produktów zaawansowanej glikacji i mikrobiomu u pacjentów nadużywających alkoholu” ma postać cyklu publikacji powiązanych tematycznie. Cykl stanowią 2 publikacje oryginalne oraz 1 publikacja będąca przeglądem systematycznym i metaanalizą:

1. **Kamil Litwinowicz**, Ewa Waszczuk, Andrzej Gamian. *Advanced glycation end-products in common non-infectious liver diseases: systematic review and meta-analysis*. *Nutrients* 2021 Vol.13 no.10 art.3370
DOI: 10.3390/nu13103370
2. **Kamil Litwinowicz**, Ewa Waszczuk, Aleksandra Kuzan, Agnieszka Bronowicka-Szydełko, Kinga Gostomska-Pampuch, Piotr Naporowski, Andrzej Gamian. *Alcoholic Liver Disease Is Associated with Elevated Plasma Levels of Novel Advanced Glycation End-Products: A Preliminary Study*. *Nutrients* 2022 Vol.14 no.24 art.5266
DOI: 10.3390/nu14245266
3. **Kamil Litwinowicz**, Andrzej Gamian. *Microbiome Alterations in Alcohol Use Disorder and Alcoholic Liver Disease*. *International Journal of Molecular Sciences* 2023 Vol.24 no.3 art.2461
DOI: 10.3390/ijms24032461

Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MEiN o sumarycznej wartości IF wynoszącym **19,62** oraz sumarycznej **Punktacji Ministerialnej (pkt MEiN) wynoszącej 420**. Praca będąca przeglądem systematycznym i metaanalizą opublikowana została w 2021 roku w czasopiśmie *Nutrients* (IF=6,706, 140 pkt MEiN), natomiast dwie prace doświadczalne w 2022 roku w *Nutrients* (IF=6,706, 140 pkt MEiN), a ostatnia w cyklu publikacja ukazała się w 2023 roku w *International Journal of Molecular Sciences* (IF=6,208, 140 pkt MEiN).

We wszystkich publikacjach składających się na cykl, będący podstawą rozprawy, Doktorant jest **pierwszym Autorem**. Warta podkreślenia jest również pozycja lek Kamila Litwinowicza jako **autora korespondencyjnego we wszystkich publikacjach** składających się na rozprawę doktorską, co wskazuje na znaczący i wiodący udział Doktoranta zarówno w projektowaniu i wykonaniu badań jak i przygotowywaniu manuskryptów wskazanych publikacji. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, których wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Pierwsza publikacja to przegląd systematyczny i metaanaliza opracowana zgodnie z wytycznymi PRISMA - preferowanych elementów raportowania dla przeglądów systematycznych i metaanaliz (ang. *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and*



Meta-analyses). Autor przeanalizował w metaanalizie dane z 11 artykułów. Kolejne 2 publikacje oryginalne analizują stężenia nowoodkrytego podtypu AGE (AGE10) u 65 pacjentów z alkoholowym zapaleniem wątroby oraz w grupie kontrolnej składającej się z 65 osób bez istotnych schorzeń (publikacja nr 2 oryginalna) oraz sekwencję 16S rRNA w grupie 122 pacjentów z AUD, 75 pacjentów z alkoholową chorobą wątroby (ALD), 54 pacjentów z chorobami wątroby o innej etiologii oraz w grupie kontrolnej 260 osób bez istotnych schorzeń.

Dysertacja liczy łącznie z piśmiennictwem 92 strony i posiada tradycyjny układ dla tego typu rozpraw doktorskich: spis treści (strona 3), wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską (strona 4), wykaz zastosowanych skrótów (strona 5), streszczenie w języku polskim i angielskim (strony 6-9), wstęp (strony 10-12), cele (strona 13), materiały i metody (strony 14-16), wyniki (strony 17-18), piśmiennictwo (strony 19-20), publikacje wchodzące w skład cyklu (strony 21-82), wnioski (stronie 83), oświadczenia współautorów (strony 84-90) oraz notkę biograficzną (strony 91-92). Podsumowując, układ recenzowanej dysertacji jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań.

Rozprawa jednoznacznie wykazuje indywidualny wkład Kandyda przy tworzeniu koncepcji, wykonywaniu części badawczej, opracowaniu i interpretacji wyników publikacji naukowych składających się na cykl publikacji powiązanych tematycznie. Rozprawa spełnia również kryteria formalne (art.187) Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.).

Poprawność formułowania problemów, hipotez, założeń badawczych

Doktorant przejrzysto i rzeczowo precyzuje w Autoreferacie założenia i cel pracy:

- określenie powiązania klasycznych AGE z alkoholową chorobą wątroby,
- ocena powiązania AGE10 z alkoholowym zapaleniem wątroby,
- określenie dokładności diagnostycznej AGE10 w alkoholowym zapaleniu wątroby
- zbadanie zaburzeń mikrobiomu w zaburzeniu używania alkoholu i alkoholowej chorobie wątroby (ALD).

Ponadto formułuje 7 celów szczegółowych, które systematyzują i porządkują schemat badawczy Doktoranta:

1. Ocena powiązania alkoholowego zapalenia wątroby ze stężeniem AGE10 w osoczu.
2. Określenie zależności pomiędzy wiekiem i płcią a stężeniem AGE10 w osoczu
3. Określenie korelacji pomiędzy wykładnikami uszkodzenia wątroby (AST, ALT, bilirubina i GGTP) a stężeniem AGE10 w osoczu
4. Ocena dokładności diagnostycznej AGE10 w odróżnianiu pacjentów z alkoholowym zapaleniem wątroby od zdrowych
5. Ocena powiązania i dokładności diagnostycznej klasycznych typów AGE z ALD.
6. Ocena zaburzeń mikrobiomu związanych z AUD i ALD.
7. Określenie powiązania mikrobowej α -galaktozydazy z ALD.



Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Założenia i metody pracy, dobór technik badawczych i analiza uzyskanych wyników nie budzą zastrzeżeń. Warsztat technik jest wyważony, zapewnia uzyskanie jednoznacznych wyników przy przyjętych metodach walidacji i weryfikacji. Świadczy o dużej wiedzy Doktoranta oraz odpowiedzialności naukowej. Dane biologiczno-doświadczalne są starannie udokumentowane i opisane.

Dobór piśmiennictwa, umiejętność wykorzystywania źródeł

Piśmiennictwo wskazane w Autoreferacie obejmuje 21 pozycji bezpośrednio związanych z tematyką pracy - są właściwie dobrane i odpowiednio cytowane. Piśmiennictwo wskazane w poszczególnych publikacjach składających się na cykl obejmuje odpowiednio 56, 71 oraz 61 pozycji.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Temat pracy, trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Doktorat podjął niezwykle ważny, zarówno klinicznie jak i społecznie, problem poszukiwania użytecznego klinicznie markera wspomagającego opiekę kliniczną osób chorujących na alkoholową chorobę wątroby (ALD). Według Światowej Organizacji Zdrowia choroby związane ze spożyciem alkoholu stanowią 10% wszystkich schorzeń. W krajach Unii Europejskiej przyczyną 27% zgonów ludzi młodych w wieku 15–29 lat jest alkohol. W Polsce według Państwowej Agencji Rozwiązywania Problemów Alkoholowych, 2-2,5 miliona osób nadużywa alkoholu, a około 800 tysięcy osób jest uzależnionych. Zaburzenia związane z używaniem alkoholu (AUD) są jednym z najbardziej znaczących czynników przyczyniających się do globalnego śmiertelności i chorób dla ponad 200 chorób, z których ponad 40 z nich można w pełni przypisać alkoholowi. Spośród nich alkoholowa choroba wątroby (ALD) jest największym czynnikiem przyczyniającym się do szkód zdrowotnych powodowanych przez AUD. Cięższe postacię hepatopatii alkoholowej obejmują alkoholowe zapalenie wątroby charakteryzujące się przetrwałym naciekiem zapalnym w wątrobie oraz marskość, charakteryzującą się postępującym bliznowaceniem tkanki wątrobowej. Badania prowadzone w ciągu minionych 5 lat znacznie zwiększyły zakres naszego rozumienia mechanizmów, na drodze których spożycie alkoholu powoduje uszkodzenie wątroby. Pomimo postępu technologicznego, naukowego i medycznego rozpoznanie i dokładne określenie stopnia zaawansowania ALD wciąż pozostaje wyzwaniem. Mimo udokumentowanego 2% ryzyka poważnych powikłań, biopsja wątroby w połączeniu z udokumentowanym nadmiernym spożyciem alkoholu nadal pozostaje złotym standardem diagnostycznym ALD. Inwazyjny charakter biopsji wątroby wskazał potrzebę opracowania



nowych, nieinwazyjnych metod dokładnego określenia stopnia zaawansowania ALD. Identyfikacja osób o zwiększonym ryzyku progresji do bardziej zaawansowanych stadiów ALD może potencjalnie pomóc w opracowaniu nowych i bardziej spersonalizowanych podejść do leczenia i zapobiegania ALD. W odpowiedzi na potrzebę poszukiwania skutecznego i użytecznego klinicznie markera wspomagającego wczesne wykrycie AH i w konsekwencji zapobieżenie nieodwracalnemu uszkodzeniu wątroby, bazując na złożonej patofizjologii ALD, Doktorant podjął się zbadania użyteczności klinicznej zmian w mikrobiomie oraz akumulacji końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE) jako potencjalnych czynników mogących wspomóc nieinwazyjną diagnostykę zaawansowania klinicznego ALD. W kontekście badania związanego z produktem zaawansowanej glikacji jako drugorzędny cel Doktorant podjął próbę zapewnienia dokładności diagnostycznej AGE10 w ALD.

Mocną stroną badań przeprowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy jest dobrze zaplanowane badanie, wnikliwe zapoznanie się z dostępną wiedzą naukową w poruszanej tematyce oraz dbałość o precyzyjny warsztat naukowo-badawczy. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktoranta do tematyki pracy doktorskiej, przemyślanym i krytycznym planowaniu badania, skrupulatnej analizie dostępnych danych literaturowych.

Tak więc, podjęcie tematu badawczego będącego tematem niniejszej dysertacji zaowocowało oryginalnymi i ciekawymi wynikami naukowymi istotnie wzbogacającymi wiedzę naukową w dyscyplinie.

Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Autor potrafił w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnienia, naświetlić cele i przebieg badań.

Przegląd systematyczny i metaanaliza przeprowadzone przez Autora w publikacji nr 1 zostały wstępnie zarejestrowane w PROSPERO (CRD4201240954) i przeprowadzone zgodnie z wytycznymi PRISMA. Doktorant metaanalizę przeprowadził przy użyciu pakietu meta R na danych pochodzących z 11 badań, spełniających założone kryteria włączenia, obejmujących dane dotyczące 1844 uczestników (909 z nie-alkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (NAFLD), 169 z ALD i 766 zdrowych osób z grupy kontrolnej).

Autor zauważył i podkreślił, iż tylko pojedyncze badania analizowały AGE w kontekście ich dokładności diagnostycznej. Fluorescencja AGE rozróżniała niskie i umiarkowane stłuszczenie z AUC. W wyniku przeprowadzonych analiz Autor wykazał znacznie wyższe poziomy AGE w NAFLD i ALD. Krytycznie jednakże wskazał brak istotnych różnic w stężeniu tej AGE pomiędzy pacjentami z alkoholową marskością i alkoholowym zapaleniem wątroby. Żadna z zakwalifikowanych prac nie uwzględniała w swoich wynikach dokładności diagnostycznej dla alkoholowej choroby wątroby.

W drugiej doświadczalnej publikacji naukowej Doktorant przeprowadził badanie własne i wskazał istotnie wyższe stężenie AGE10 w osoczu pacjentów z alkoholowym



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

zapaleniem, $p < 0.001$). Nie wykazał istotnej korelacji pomiędzy stężeniem AGE10 a ALT, AST, GGTP, bilirubiną, wiekiem lub płcią uczestników badania. Ponadto, AGE10 wykazał akceptowalną skuteczność jako marker diagnostyczny AH – z miarą dobroci i trafności modelu wyrażonego jako pole pod wykresem krzywej ROC (AUC) wynoszącym 0,78. Dla wartości odcięcia czułość wynosiła 75% a swoistość 72%. Podsumowując, lek. Kamil Litwinowicz wykazał iż AH było związane z podwyższonym poziomem nowego zaawansowanego produktu końcowego glikacji AGE10. wątroby w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej (odpowiednio 184.5 ± 71.1 $\mu\text{g/mL}$ i 123.5 ± 44.9

W trzecim badaniu stanowiących cykl publikacji powiązanych tematycznie Autor analizował zmiany mikrobiomu, jednego z najważniejszych czynników wpływających na przebieg na przebieg zaburzeń związanych z używaniem alkoholu (AUD). Ostatnie postępy w bioinformatyce umożliwiły Doktorantowi odpowiedni warsztat umożliwiający dokładniejszą charakterystykę zmian w składzie mikrobiomu.

Badana populacja składała się z 122 pacjentów z AUD, 75 z ALD, 54 z niealkoholowymi chorobami wątroby i 260 zdrowych osób z grupy kontrolnej. Autor wskazał zmiany w mikrobiomie, które były spójne w wielu zestawach danych. Do najważniejszych zmian należy spadek *Firmicutes* u pacjentów z AUD i ALD. Nie wykazał istotnych różnic w poziomie *Bacteroidetes*, ani w stosunku *Firmicutes/Bacteroidetes*, stanowiącego często stosowany wykładnik zdrowej mikroflory. Zmniejszenie proporcji *Firmicutes* w największym stopniu spowodowane było przez redukcję w rodzinach *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* i *Butyricocccaceae*, które zawierają liczne bakterie produkujące maślan, krótkołańcuchowy kwas tłuszczowy (SCFA) o właściwościach przeciwzapalnych i działający protekcyjnie na barierę jelitową. Redukcja tych korzystnie działających taksonów była większa u pacjentów z ALD w porównaniu z pacjentami z AUD bez choroby wątroby. Oprócz tego w AUD i ALD wykazał proporcjonalnie wyższy udział typu *Proteobacteria*, zawierającego bakterie wytwarzające silnie immunogeny lipopolisacharyd. Zaobserwowany wzrost był większy u pacjentów z ALD w porównaniu z AUD bez choroby wątroby. Na poziomie rodziny najistotniejszy wzrost bakterii z *Proteobacteria* zaobserwowano w *Enterobacteriaceae* i *Burkholderiaceae*, które powiązane są z rozwojem ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Pacjenci z ALD mieli istotnie niższą alfa-różnorodność w porównaniu z grupą AUD bez choroby wątroby. Analiza profilu funkcjonalnego wykazała między innymi zwiększenie aktywności szlaków związanych z syntezą lipopolisacharydu u pacjentów z ALD w porównaniu z grupą AUD bez choroby wątroby. Nie wykazał istotnych różnic w aktywności α -galaktozydazy pomiędzy AUD, ALD i grupą kontrolną. Podsumowując, przeprowadzona przez Doktoranta analiza metagenomiczna wykazała że ALD wiąże się ze wzrostem wielu szlaków związanych z bakteryjną syntezą hemu, które do tej pory nie były badane w kontekście alkoholowej choroby wątroby. Ponadto analiza głębokiego uczenia wykazała znaczną zmienność w przewidywaniu opartym na mikrobiomie AUD. Otrzymane przez lek. Kamila

CP



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Litwinowicza wyniki wskazują, że AUD wiąże się może z negatywnymi zmianami mikrobiomu, które mogą być mechanicznie powiązane z uszkodzeniem wątroby.

Badania przeprowadzone przez lek. Kamila Litwinowicza mają zatem istotne implikacje poznawcze i kliniczne. **Stanowią element nowości, stanowiący oryginalne osiągnięcie Doktoranta.**

Podsumowując wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej stanowią znaczący wkład w dotychczasową wiedzę naukową i medyczną dotyczącą ALD i są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania zarówno w diagnostyce jak i monitorowaniu omawianej choroby.

Poprawność językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem z użyciem prawidłowej stylistyki i terminologii. Wartość merytoryczna publikacji idzie w parze z umiejętnością argumentacji i polemiki. Edycja pracy jest prawidłowa.

UWAGI I PROPOZYCJE

Z obowiązku Recenzenta chciałabym zwrócić uwagę o ważnym brakującym aspekcie jednoznacznie podsumowującym omówienie wyników prezentowanych przez Doktoranta. Tym brakującym elementem dysertacji są wnioski i dyskusja stanowiące krytyczne spojrzenie Doktoranta na otrzymane przez niego wyniki. Pomimo iż te dwa rozdziały zawarte są w publikacjach stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej, winny jednak znaleźć się w autorefracie.

Wszystkie wymienione zastrzeżenia w żaden jednak sposób nie umniejszają wartości pracy. **Po wnikliwej lekturze dysertacji zatytułowanej „Ocena produktów zaawansowanej glikacji i mikrobiomu u pacjentów nadużywających alkoholu” oceniam ją bardzo wysoko. Jest to obszerne i samodzielne opracowanie i rozwiązanie oryginalnego zagadnienia naukowego przy użyciu nowoczesnych metod i jest dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.**

PODSUMOWANIE

Zdaniem Recenzenta, oceniana **dysertacja doktorska lek. Kamila Litwinowicza** pt. „, wykonana w pod opieką promotora prof. dr hab. Andrzeja Gamian **spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora** zdefiniowane w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.). Recenzowana przez mnie **rozprawa doktorska autorstwa lek. Kamila Litwinowicza prezentuje adekwatną ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie oraz**

Cyf



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej potwierdzonej publikacją wyników będących podstawą rozprawy doktorskiej w renomowanych czasopismach naukowych o znaczącym współczynniku wpływu. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a indywidualny wkład Kandydata w powstanie tej pracy jest wystarczający i udokumentowany.

Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Kamila Litwinowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy Autora wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Kamila Litwinowicza.

Wrocław, 23.05.2023

Laboratorium Immunopatologii
Edyta Pawlak
dr hab. n. med. Edyta Pawlak, prof. PAN
Kierownik