

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Michała Roberta Batora pod tytułem:
„Rola mikrobioty jelitowej u chorych na szpiczaka plazmocytoowego”.**

Szpiczak plazmocytoowy (MM) jest chorobą nowotworową charakteryzującą się niekontrolowanym rozrostem klonalnych plazmocytoów wywołanym przez wewnątrzkomórkowe zaburzenia genetyczne. Komórki szpiczaka plazmocytoowego charakteryzują się zwiększoną proliferacją i zdolnością do przerzutów. MM jest spowodowany mutacjami punktowymi i/lub aberracjami chromosomowymi. Te ostatnie obejmują translokacje, delecje i duplikacje, które są obecne w komórkach plazmatycznych. Objawy i następstwa tej choroby nowotworowej zależą nie tylko od nadmiaru określonego rodzaju komórek nowotworowych (w tym wypadku patologicznych plazmocytoów), ale także od wytwarzanego przez te komórki białka monoklonalnego (M) oraz różnego rodzaju cytokin. Zmiany cytogenetyczne są istotnymi czynnikami prognostycznymi w przebiegu MM. Mimo że MM jest rzadkim nowotworem i stanowi około 1% wszystkich nowotworów, to jest jednym z najczęściej występujących nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego (10–15%). Większość (90%) przypadków szpiczaka plazmocytoowego jest rozpoznawanych u chorych powyżej 50 roku życia, a mediana wieku w czasie rozpoznania wynosi około 70 lat. Poznanie biologii MM i wprowadzenie nowych leków do terapii tej choroby wpłynęło na zmianę jej postrzegania.

Mikrobiota jelitowa człowieka została wykazana jako ważny czynnik regulujący rozwój i progresję chorób u ludzi, kolonizację patogenów i odpowiedź immunologiczną. Zmiany w tym ekosystemie mogą prowadzić do miejscowego lub ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Aktywność immunologiczna w jelitach, pod wpływem zmian indukowanych przez mikrobiom i metabolity, ma zdolność wpływania na komórki odpornościowe w odległych narządach/ szpiku kostnym (BM) i może odgrywać rolę w rozwoju nowotworów hematologicznych. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że na odpowiedź gospodarza na chemioterapeutyki może wpływać mikrobiota jelitowa, głównie w zakresie promowania skuteczności leków, znoszeniu efektów przeciwnowotworowych i modulacji toksyczności. Jak dotąd przeprowadzono relatywnie niewiele badań w opisywanym zakresie u chorych na szpiczaka plazmocytoowego, co więcej często wyniki tych badań są niespójne i niejednoznaczne. W Polsce tego typu badania nie były jeszcze realizowane.

Stąd też głównym celem pracy lekarza Michała Roberta Batora było zbadanie mikrobiomu w populacji polskich chorych ze świeżo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym (*Newly diagnosed multiple myeloma*, NDMM) w odniesieniu do składu mikrobiomu zdrowych Polaków.

W pracy Autor postanowił odpowiedzieć na następujące pytania:

1. Czy występują różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy polską populacją chorych na NDMM i osób zdrowych ?
2. Czy występujące różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy chorymi na NDMM a zdrowymi osobami mogą przyczynić się do rozwoju choroby /
3. Czy istnieją różnice w obfitości względnej pomiędzy badanymi grupami wśród bakterii powiązanych z metabolizmem krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych ?

Dodatkowym celem pracy było bankowanie informacji na temat mikrobiomu osób populacji polskiej, z możliwością wykorzystania do dalszych analiz.

Badania przeprowadzono w ramach realizacji projektu, tytuł projektu: „ProHum - Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska - planowanie badań eksperymentalnych, tworzenie i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami transferowania ich do badań klinicznych w medycynie człowieka” (POWR.03.02.00-00-I008/17-0 i numer projektu SIMPLE: POWR.F008.19.002.), Kierownik Projektu- Prof . Marcin Nowak. Środki niezbędne do realizacji wyżej wymienionego projektu pochodziły z Projektu ProHUM oraz z wsparcia finansowego Rektora ds. Nauki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Wrocławiu (KB - 415/2021).

Każdemu choremu przedstawiono projekt badania, jego cele oraz prośbę o dobrowolne podpisanie świadomej zgody na udział w badaniu.

Do badania włączono 19 chorych zdiagnozowanych w latach 2021-2022, w Klinice Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu . Grupę badaną stanowili pacjenci ze świeżo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym (*Newly diagnosed multiple myeloma*, NDMM).

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych osób: 8 kobiet i 12 mężczyzn w średnim wieku 60 lat, zakres [45 lat- 78 lat]. Dobór osób grupy kontrolnej pod względem płci i wieku odpowiadał grupie badanej. Do badania kwalifikowani byli zdrowi ochotnicy, nie obciążeni

nowotworem jelita grubego, niespecyficznym zapaleniem jelit, którzy zadeklarowali, że co najmniej 90 dni przed oddaniem próbki stolca do badania nie przyjmowali antybiotyków.

Badania zostały przeprowadzone w Laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu, Pracowni Cytometrii Przepływowej Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu, Pracowni Cytochemii i Cytomorfologii Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu, Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu .

U wszystkich pacjentów przeprowadzono diagnostykę zgodnie z obowiązującymi zaleceniami i postawiono rozpoznanie zgodnie z kryteriami IMWG. W oparciu o przeprowadzone badania chorych zakwalifikowano do leczenia indukującego remisję choroby w oparciu o obowiązujące standardy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje wraz ze streszczeniami, wykresami, rycinami i tabelami 104 strony wydruku komputerowego. Układ pracy przedstawiony w spisie treści jest poprawny.

We **wstępie** Autor szczegółowo omawia aktualny stan wiedzy na temat szpiczaka plazmocytozy i roli mikrobiomu człowieka i potencjalnego zastosowania wyników badań nad nim w hematologii i onkologii.

Postawione **cele pracy** należy uznać za godne realizacji.

Pacjenci i metody stanowią kolejny rozdział, szczegółowo opisujący przebieg badania.

Wyniki podane są w osobnym rozdziale w formie graficznej i opisowej, pozwoliły one na sformułowanie następujących wniosków, które zostały przedstawione w sposób opisowy i stanowią w większości odpowiedzi na postawione cele pracy:

1. Mikrobiom chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytozy i mikrobiom osób zdrowych różnią się w aspekcie różnorodności beta.

2. Różnice pomiędzy mikrobiomami chorych na NDMM i zdrowych występują w każdej z 4 podstawowych metryk: Jaccard, Bray-Curtis, Unweighted-unifrac, Weighted-unifrac.
3. Określone taksony występują w różnej obfitości w mikrobiomie jelitowym osób zdrowych i chorych z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytowym. Różnice w obfitości względnej występują na różnych poziomach taksonomicznych.
4. Rodziny bakterii które wykazują różnice względnej obfitości pomiędzy chorymi i zdrowymi są następujące: Peptostreptococcaceae, Lachnospiraceae, Staphylococcaceae. Rodzaje bakterii wykazujące różnice we względnej obfitości wykazano wśród bakterii należących do : Lachnospiraceae UCG-008, Erysipelotrichaceae UCG-003 , Anaerostipes.
5. W mikrobiomie osób chorych i zdrowych występują różnice w obfitości względnej pomiędzy bakteriami uczestniczącymi w metabolizmie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych.
6. Mikrobiom chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytozowego i mikrobiom osób zdrowych nie różnią się w aspekcie różnorodności alfa, w żadnej z czterech podstawowych miar: Indeks Shannon, Pielou's Evenness, Observed Features (OF), Faith's Phylogenetic Diversity (PD).

W Omówieniu wyników i dyskusji Autorka w sposób zwięzły i szczegółowy ocenia uzyskane przez siebie wyniki i porównuje je z rezultatami badań przeprowadzonych, opublikowanych przez innych lekarzy.

Piśmiennictwo jest bardzo rozbudowane, dobrane właściwie, w zdecydowanej większości pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że stanowi ona kolejny krok w zastosowaniu analizy mikrobiomu człowieka w poszukiwaniu nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, wskazówek co do przyczyn rozwoju szpiczaka plazmocytozowego i miejmy nadzieję w projektowaniu terapii u chorych na ten nowotwór.

W pracy lekarz Michał Robert Bator wykazał się bardzo dobrą znajomością warsztatu jakim powinien się posługiwać pracownik naukowy- lekarz. Na wyróżnienie zasługuje perfekcyjne wykorzystanie skomplikowanych metod statystycznych do opracowania uzyskanych wyników.

Wyróżniki/auty pracy

Prowadzone aktualnie na świecie badania analizują wpływ diety na ilościowy i jakościowy skład mikrobiomu. W jednym z badań opublikowanych w 2020 roku, dotyczących wyników leczenia i czasu przeżycia 423 pacjentów z MM wykazano, że mniejszą śmiertelność i dłuższy całkowity czas przeżycia obserwowano w grupie chorych z wzorcem żywieniowym opartym na roślinach. Diety oparte na pokarmach roślinnych są bogate w rozpuszczalny błonnik, dodatkowo wykazują większy poziom bakterii zaliczanych do Bacteroidetes, Lactobacilli, Bifidobacteria i Clostridium clusters. Wymienione grupy bakterii obejmują Eubacterium, Roseburia, Faecalibacterium. Bakterie te mają zdolność rozkładania błonnika oraz uczestniczą w wytwarzaniu krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) propionianu, maślanu i octanu, które wykazują w jelitach silne działanie przeciwzapalne. Styl odżywiania i skład pożywienia osób zamieszkujących kraje Europy Zachodniej i Stany Zjednoczone są uboższe w błonnik, co wpływa na ilość SCFA. Być może również dieta modyfikując skład mikrobiomu, wpływa na różnice w ilości zachorowań na szpiczaka plazmocytozy w różnych częściach świata.

W analizie uzyskanych wyników Autor wykazał różnice istotne statystycznie wśród bakterii zaliczanych do rodzin:

- Peptostreptococcaceae ($p < 0.0163$)
- Lachnospiraceae ($p = 0.016$)
- Staphylococcaceae ($p = 0.01$)

Dodatkowo wykazano różnice w obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do rodzaju:

- Lachnospiraceae UCG-008 ($p << 0.001$)
- Erysipelotrichaceae UCG-003 ($p = 0.0015$).
- Anaerostipes ($p << 0.001$).

Obfitość względna wymienionych bakterii była istotnie mniejsza w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych. Wymienione Rodziny i grupy bakterii

uczestniczą między innymi w metabolizmie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych i przez to wpływają na układ immunologiczny gospodarza.

1. Jest to pierwsza analiza populacji polskiej porównującą mikrobiom osób zdrowych i chorych na NDMM, jeszcze przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego. Prezentowane wyniki są pierwszym opracowaniem zmian we względnej obfitości bakterii w polskiej populacji.
2. Zmiany względnej obfitości wśród bakterii Gatunku Erysipelotrichaceae UCG-003 mogą mieć znaczenie w rozwoju stanów zapalnych jelit chorych na szpiczaka plazmocytozowego

Jest jeszcze jedna wartość pracy- doskonały rys historyczny przedstawiający etapy poznawania szpiczaka plazmocytozowego, wprowadza pojęć medycznych stasowanych w tej jednostce chorobowej, to samo dotyczy mikrobiomu człowieka. Za to Recenzent jako miłośnik historii, w tym historii medycyny bardzo dziękuje.

Powyższe fakty stanowią moim zdaniem podstawę do wyróżnienia pracy.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na:

Ograniczenie pracy:

1. Zbyt mała liczebność ocenianych grup uniemożliwia ich zastosowanie w praktyce klinicznej i b. utrudnia odpowiedź na postawiony drugi cel pracy- :Czy występujące różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy chorymi na NDMM a zdrowymi osobami mogą przyczynić się do rozwoju choroby ?” Oczywiście wymaga to dalszych badań, do wykonania których już teraz Doktoranta zachęcam.

Usterki:

1. Na stronie 104 pracy nagłówek wskazuje, że powinna być załączona w tym miejscu zgoda Komisji Bioetycznej, w mojej wersji dokumentu stwierdzam jej brak- do uzupełnienia w ostatecznej wersji.

2. W alfabetycznym wykazie skrótów używanych w tekście niektóre terminy wymagają poprawek, np.: chimera fitering- potrzebne wyjaśnienie po polsku, NAFLD- zmiana z tłuszczeniowej choroby wątroby na stłuszczeniową; OF, PD, wykres PcoA- konieczne tłumaczenie na język polski.
3. Strona 12 jest szpiczak mnogi, powinien być szpiczak plazmocytowy.
4. Brakuje trochę pauz między wyrazami, np.: strona 16 drugi wiersz w tabelce, strona 42 ostatni wiersz na stronie.
5. Strona 20 zdaniem recenzenta powinna być interleukina 6 a nie 8 oraz cytometria a nie cystometria.
6. Braki ortograficzne; konieczna zmiana na stronie 48 - 4 wiersz.
7. Przyimki i spójniki nie powinny być zastawiane na końcu wiersza tylko przenoszone do nowego.

Pomimo istnienia tych niedoskonałości pracę oceniam bardzo pozytywnie ze względu na zaprezentowany materiał oraz istotne klinicznie refleksje nad nim.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2028 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668).

Uważam, że lek Michał Robert Bator powinien być dopuszczony do dalszych etapów przewodu doktorskiego a jego rozprawa z uwagi na pionierski charakter prowadzonych badań i uzyskanych wyników zasługuje na wyróżnienie.

Jednocześnie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.