



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Klinika Neonatologii

Kierownik; prof. dr hab. med. Barbara Królak-Olejniki

Wasze pismo z dnia:

Wasz znak:

Nasz znak:

Data

WL-30/ /23 Wrocław 20.06.2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej

lek. Magdy Fraszczyk-Tousty,

pt.: „Ocena bariery jelitowej u dzieci do 2 roku życia w oparciu o stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych”

Kolonizacja przewodu pokarmowego noworodka, na którą wpływ mają zarówno czynniki środowiskowe, ale również perinatalne, w tym schorzenia i leki przyjmowane przez matkę, antybiotykoterapia, sposób ukończenia ciąży, a także postnatalne. Kształtowanie się mikrobioty jest decydującym momentem dla rozwoju układu odpornościowego i kształtowania tolerancji immunologicznej. Zaburzenia tego procesu, wywołujące dysbiozę w pierwszym okresie życia mogą się wiązać z wystąpieniem szeregu chorób w przyszłości. Noworodek w trakcie porodu ma bezpośredni kontakt z florą bakteryjną matki i środowiska zewnętrznego. Niestety ten z cięcia cesarskiego pozbawiony jest kontaktu z mikrobiotą przewodu pokarmowego i dróg rodnych matki, co powoduje dysbiozą jelitową obserwowaną już w pierwszych godzinach, a następnie dniach i miesiącach życia dziecka. Cechą charakterystyczną tej dysbiozy jest brak względnie beztlenowych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* pochodzących z mikrobioty fekalnej matki, tj. bakterii, które wymagają środowiska bogatego w tlen w jelicie noworodka, czego następstwem jest obniżenie kolonizacji bezwzględnie beztlenowcami, głównie gatunków z rodzaju *Bacteroides* i *Bifidobacterium*.

Już w pierwszych dniach życia wykazano dominację mikroorganizmów kolonizujących skórę matki, tj. *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. i *Propionibacterium* spp. Częściej izolowano także bakterie pochodzące ze środowiska szpitalnego - *Enterococcus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella*, *Enterobacter cloacae* i *Clostridium perfringens*. Natomiast u dzieci urodzonych drogami natury dominują bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Escherichia* i *Bacteroides/Parabacteroides*. Pewne kontrowersje dotyczą liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Nie potwierdzono różnic w pierwszym tygodniu życia pomiędzy noworodkami z cięć cesarskich a urodzonymi naturalnie, co wskazywałoby na większe znaczenie mikrobioty fekalnej matki niż waginalnej w rozwoju mikrobiomu przewodu pokarmowego niemowląt. Na podstawie badań prospektywnych oraz przeglądów systematycznych badań wykazano, że wczesna dysbioza jelitowa utrzymuje się co najmniej przez pierwsze 2 lata życia (brak jest badań prowadzonych w dłuższym okresie). Wiele prac opublikowano w tym zakresie, ale temat nadal jest otwarty. Pośrednią metodą oceny składu mikrobioty, a właściwie jej metabolizmu są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe – kwas octowy, propionowy, masłowy. Ich działanie nie ogranicza się do przewodu pokarmowego, kształtują między innymi układ immunologiczny, mają znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego, sercowo-naczyniowego. Brakuje danych dotyczących wpływu czynników perinatalnych na barierę jelitową ocenianą na podstawie stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Zatem temat poruszony przez doktorantkę jest szczególnie interesujący, dotyczy bowiem analizy kwasu octowego, propionowego i masłowego w stolcu noworodków, niemowląt i małych dzieci do 2 roku życia w zależności od różnych czynników matczyńskich i noworodkowych.

Rozprawa doktorska ma układ typowy, na 91 stronach maszynopisu lek. Magda Fraszczyk-Tousty umieściła wykaz skrótów, wstęp, cel i założenia badania, materiał i metody, wyniki, dyskusję i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis tabel (23) i rycin (14) oraz piśmiennictwo. W sposób bardzo zwięzły, ale w pełni zrozumiały i akceptowalny, przedstawiła najistotniejsze dane dotyczące mikrobioty i kolonizacji przewodu pokarmowego człowieka w początkowym okresie życia. Omówiła syntezę krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) w przewodzie pokarmowym, ich znaczenie dla prawidłowego rozwoju człowieka.

Celem pracy była ocena wpływu wybranych czynników ze strony matki i dziecka na stan bariery jelitowej ocenianej na podstawie stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w stolcu dzieci do 2 roku życia. Uwzględniono BMI matki, przyrost masy ciała w ciąży, antybiotykoterapię, sposób ukończenia ciąży oraz masę ciała dziecka, płeć i sposób karmienia. Praca doktorska jest kontynuacją badań prowadzonych w Klinice Położnictwa, Ginekologii i Neonatologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, dotyczących bariery jelitowej zdrowych noworodków i ich matek. Badanie zostało zaakceptowane przez komisję bioetyczną PUM w Szczecinie (nr: KB 0012/55/15 z dn. 30.06.2014).

Materiał i zastosowane metody badań zostały szczegółowo opisane przez doktorantkę. Do badania włączono 100 noworodków zdrowych urodzonych w terminie porodu i ich matki. Dzieci przyszły na świat w okresie od marca 2015 do kwietnia 2016 w Klinice Położnictwa, Ginekologii i Neonatologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. W tabeli 1. gdzie scharakteryzowano grupę noworodków liczebność badanej grupy wynosi 86, z jakiej przyczyny wykluczono 14 noworodków? W kolejnych okresach scharakteryzowano 83 dzieci w 1 miesiącu, 78 - w szóstym miesiącu, 76 - w dwunastym i 71 - w dwudziestym czwartym. W tym samym czasie pobierano smółkę, a następnie stolec, kontaktując się z rodzicami także w celu zebrania wywiadu. Czy rodzice przyjeżdżali do Poradni Neonatologicznej, czy kontakt z nimi był telefoniczny? Dlaczego w kolejnych okresach liczebność była mniejsza, najpewniej nie udało się skontaktować z rodzicami, ale nie opisano tego w pracy doktorskiej.

W pierwszym tygodniu życia noworodki były karmione wyłącznie piersią. Nie uwzględniono tego w kryteriach włączenia, podobnie w kryteriach wykluczenia nie znajduje się karmienie piersią, czy dokarmianie mieszanką. W pierwszym miesiącu tylko 17% noworodków było karmionych mieszanką, czy zatem aż 83% było karmionych wyłącznie piersią? jaki odsetek stanowiły dzieci karmione w sposób mieszany, ma to istotne znaczenie dla oceny mikrobioty, a zatem bariery jelitowej i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

Bardzo szczegółowo opisano metodykę pobierania i przechowywania smółki i stolca, podobnie jak analizę stężenia kwasów octowego, propionowego, masłowego, masłowego rozgałęzionego i masłowego liniowego, za pomocą chromatografii gazowej.

Gdzie wykonywano badania, czy były możliwe w laboratorium szpitalnym czy podpisano umowę z laboratorium zewnętrznym? Wykonywano także oznaczenia CRP i IL-6 w krwi pępowinowej noworodków w Laboratorium Centralnym SPSK nr 2 w Szczecinie.

Analizowano stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych - octowego, propionowego, masłowego rozgałęzionego i liniowego, sumy kwasu masłowego i sumy wszystkich kwasów tłuszczowych w stolcu dzieci. Badano wpływ antybiotykoterapii podczas ciąży i porodu, przedciążowego BMI matek oraz przyrostu masy ciała w ciąży, rodzaju porodu, urodzeniowej masy ciała dzieci, ich płci oraz sposobu karmienia. W tabeli dotyczącej charakterystyki matek ujęto antybiotykoterapię w trakcie ciąży i porodu. Czy uwzględniono antybiotykoterapię związaną z dodatnim wynikiem badania w kierunku GBS u kobiet rodzących drogami natury oraz antybiotykoterapię okołoperacyjną. U wszystkich ciężarnych przed cięciem cesarskim zgodnie z obowiązującymi zaleceniami należy zastosować profilaktykę antybiotykową, od 30 do 120 minut przed procedurą cięcia cesarskiego. Warto także w przygotowaniu pracy do druku uwzględnić wiek matek oraz rodność i kolejność porodu.

W stosunku do zaprezentowanych wyników dobrze dobrano metody statystyczne. Wykorzystano pakiet oprogramowania Statistica 13.

Uzyskano stosunkowo dużo danych bowiem przedstawiono stężenie poszczególnych kwasów i wszystkich SCFA i zależności wobec wybranych czynników matczyńskich i noworodkowych. Czy spośród 100 badanych noworodków uzyskano smótkę tylko od 20? Liczebność dzieci u których wykonano oznaczenia SCFA w stoku odbiega od liczebności zarówno dzieci jak i matek scharakteryzowanych w rozdziale materiał. Konieczne wyjaśnienie i omówienie przyczyn nie pozyskania materiału od całej włączonej do badania grupy noworodków i niemowląt.

Tabele umieszczone w wynikach są bardzo obszerne, np. Tabela 21. Wpływ BMI matek przed ciążą na stężenie SCFA zajmuje 6 stron (str.43-48). Niestety nie ułatwia to czytania uzyskanych wyników, zwłaszcza, że opisy do tabel i rycin znajdują się na stronach poprzedzających. Doktorantka na podstawie swoich badań wykazała dużą zmienność stężeń krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w stolcu noworodków, niemowląt i małych dzieci. Stężenie całkowite SCFA w stolcu wykazywało wzrost w kolejnych miesiącach w pierwszym roku życia dzieci. Antybiotykoterapia

w okresie prenatalnym powodowała wyższe stężenia kwasu octowego, propionowego oraz sumy krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych w smółce, czyli u noworodków, natomiast w stolcu sześciomiesięcznych niemowląt były one istotnie statystycznie niższe. Natomiast u dzieci, które przyszły na świat drogą cięcia cesarskiego stężenie kwasu masłowego w stolcu do pierwszego miesiąca życia było istotnie statystycznie wyższe. Stężenie kwasu propionowego w pierwszym miesiącu oraz kwasu masłowego i całkowite stężenie kwasów tłuszczowych w dwunastym miesiącu było większe u dzieci karmionych sztucznie. Natomiast u tych urodzonych drogami natury ale karmionych sztucznie stwierdzono wyższe stężenie kwasu masłowego, octowego i całkowite stężenie SCFU w dwunastym miesiącu życia. Dzieci matek z prawidłowym BMI przed ciążą i prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży miały w stolcu wyższe stężenia kwasu mlekowego. Natomiast niemowlęta, których urodzeniowa masa ciała była powyżej 85 centyla miały wyższe stężenia kwasu masłowego w szóstym miesiącu życia. W drugim roku życia dziewczynki miały wyższe stężenia kwasu octowego niż chłopcy w tym samym wieku.

W dyskusji Doktorantka szeroko omawia własne wyniki i porównuje z danymi z piśmiennictwa. Warto jednak skupić się na wskazaniach do cięcia cesarskiego, antybiotykoterapii około operacyjnej i sposobie karmienia dzieci. Proszę wyjaśnić i omówić zmiany w stężeniu krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych w zależności od sposobu karmienia. Zostało napisane w dyskusji „U dzieci karmionych piersią obserwowano narastające wydalanie SCFA przez cały okres badania, czyli do 2 roku życia. U karmionych sztucznie wydalanie SCFA pozostawało na tym samym poziomie od 12 miesiąca życia. Może to świadczyć o szybszym dojrzewaniu metabolicznym mikrobioty dzieci karmionych sztucznie.” Proszę wyjaśnić i omówić „dojrzewanie mikrobioty”, a raczej dysbiozę wynikającą z wprowadzania karmienia innego niż naturalne. Czy faktycznie szybszemu dojrzewaniu sprzyja żywienie sztuczne oparte na mleku obcym gatunkowo? Czym można tłumaczyć tak odmienne wyniki dotyczące stężenia SCFA u osób dorosłych i dzieci w zależności od płci. Czy pacjentki otrzymywały profilaktykę antybiotykową okołoperacyjną i czy możliwe jest wydzielenie tej grupy dzieci? Warto przedstawić korelacje wieloczynnikowe, uwzględniając sposób ukończenia ciąży, antybiotykoterapię, karmienie naturalne i sztuczne oraz BMI i masę ciała noworodków.

Na podstawie przeprowadzonych analiz Doktorantka przedstawiła kilka bardzo skromnych wniosków.

1. Uzyskane wyniki wskazują na dynamiczne zmiany stężenia SCFA w stolcu dzieci w pierwszym roku życia, po czym następuje stabilizacja i uzyskane stężenie jest zbliżone do wartości obserwowanych u dorosłych, co wskazuje na istotną rolę pierwszych lat życia w rozwoju funkcji metabolicznej mikrobioty.
2. Badane czynniki, takie jak przyjmowanie antybiotyków w ciąży, sposób porodu, masa ciała przed ciążą i zmiany masy ciała w ciąży oraz sposób karmienia, masa i płeć dzieci w różny sposób wpływa na profil i stężenie SCFA.
3. Z uwagi na dynamiczne i nie zawsze spójne zmiany aktywności metabolicznej mikrobioty w pierwszych dwóch latach życia ocena funkcjonowania bariery jelitowej w oparciu o stężenie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych jest niemożliwe.

Wniosek 1 zmieniałabym na: Wykazano dynamiczne zmiany stężenia SFCA w stolcu dzieci w pierwszym roku życia. Dodałabym kolejny wniosek: Stężenie SCFA w drugim roku życia jest zbliżone do wartości obserwowanych u osób dorosłych. Nie można pisać, że później następuje stabilizacja, bo kolejne badanie wykonane jest dopiero w 24 miesiącu życia, nie wiadomo jak kształtuje się mikrobiota, a zatem jej metabolity między 12 a 24 miesiącem życia dzieci.

Wniosek 2 warto rozbudować, prezentując zmiany stężeń zależne zwłaszcza od czynników matczynych

Wniosek 3 zmodyfikowałabym pisząc, że: Z uwagi na dynamiczne i nie zawsze spójne zmiany aktywności metabolicznej mikrobioty zwłaszcza w pierwszym roku życia ocena funkcjonowania bariery jelitowej w oparciu o stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest trudna. Konieczne jest zaplanowanie dalszych badań w tym zakresie.

Wyjaśnienia wymaga liczba włączonych do badania noworodków, niemowląt i dzieci. W charakterystyce pacjentów znajdują się inne liczebności niż w wynikach uzyskanych w kolejnych etapach badania. Czy badania wykonywane w kolejnych przedziałach czasowych dotyczą tych samych dzieci?

Konieczne jest ujednoczenie danych dotyczących sposobu ukończenia ciąży i antybiotykoterapii, zarówno okołoperacyjnej, jak również wynikającej z dodatknych wymazów w kierunku GBS u matki.

Warto szerzej omówić kwestię karmienia noworodków. Czy wszystkie noworodki urodzone cięciem cesarskim były karmione wyłącznie piersią? Jeżeli tak konieczne jest

omówienie procedury, która umożliwi realizację standardu opieki okołoporodowej wobec matek i noworodków po zabiegowym zakończeniu ciąży, na tak wysokim poziomie. Z badań ankietowych przeprowadzonych w Polsce wynika, że co najmniej połowa noworodków po cięciu cesarskim jest dokarmiana w szpitalu mieszanką, mimo inicjacji laktacji przez prawie 100% ich matek.

Kilka zdań wymaga stylistycznego przeredagowania. Między innymi na str. 57 „W innym badaniu, takie czynniki matczyno - płodowe jak cięcie cesarskie i antybiotykoterapia w ciąży oraz okołoporodowa, a także mniejsza masa urodzeniowa noworodka mogą wpływać na...”, na str. 63 „...suplementacja SCFA prowadziła do utraty wagi...” i „W Piśmiennictwie jest mało publikacji ...”, na str. 82 (w streszczeniu) „...100 zdrowych, donoszonych noworodków, urodzonych o czasie...”. Wielokrotnie w stosunku do SCFA i poszczególnych kwasów używane jest określenie poziom, którego należy unikać w określeniach medycznych, poprawnym jest stężenie.

Piśmiennictwo - 136 pozycji - zostało właściwie dobrane, nie uniknięto drobnych błędów pozycja 32 i 58 powtarzają się, w pozycji 136 brakuje szczegółowych danych dotyczące stron artykułu i doi. Zbędne są w nawiasach kwadratowych umieszczone we wszystkich prawie pozycjach informacje [Internet} I [cited 2023 Mar 20] oraz available from z podaną stroną www.

Uzyskane przez doktorantkę wyniki mają znaczenie przede wszystkim poznawcze. Warto zatem kontynuować badania w tym zakresie.

Rozprawa doktorska lek. Magdy Fraszczyk-Tousty, pt.: „Ocena bariery jelitowej u dzieci do 2 roku życia w oparciu o stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych” to wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe, aktualne tematycznie i dostarczające nowych dla wiedzy klinicznej danych, które uzasadniają konieczność kontynuacji badań w tym zakresie.

Podsumowując stwierdzam, że drobne uwagi krytyczne nie mają wpływu na ocenę przedstawionej mi do recenzji pracy. Doktorantka w pełni odpowiedziała na zagadnienia postawione w celu pracy i wykazała się dużą wiedzą teoretyczną w temacie badania, a także umiejętnością prowadzenia i realizacji pracy naukowej.

Rozprawa doktorska lek. Magdy Fraszczyk-Tousty, pt. „Ocena bariery jelitowej u dzieci do 2 roku życia w oparciu o stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych”, odpowiada merytorycznym i formalnym wymogom stawianym na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu oraz spełnia warunki określone w art. 187

Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz.1688). Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie lek. Magdy Fraszczyk-Tousty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab.n.med. Barbara Królak-Olejek

Kierownik Katedry i Kliniki Neonatologii

UM we Wrocławiu