

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Ocena wczesnej kolonizacji górnego odcinka przewodu pokarmowego u noworodka " mgr Renaty Witkowska-Wirstlein wykonanej pod kierunkiem

prof. dr hab. n. med. prof. dr hab. Mieczysławy Jurczk

Katedra i Zakład
Biochemii

Wydział Nauk
Medycznych w Zabrze

41-808 Zabrze ul.
Jordana 19
www.sum.edu.pl

Ludzki organizm zasiedlany jest przez drobnoustroje, które stanowią mikrobiom człowieka; są one konieczne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, w tym utrzymania jego statusu odpornościowego. Postęp technik izolacji i hodowli pozwolił na pogłębienie wiedzy na ich temat mikroorganizmów ale dopiero rozwój technik molekularnych w późnych latach XX wieku, zrewolucjonizował wiedzę na temat mikrobiomu skóry, przewodu pokarmowego oraz układu oddechowego, w tym w dolnych jego odcinków – płuc, a także dróg moczowo-płciowych.

Człowiek w sposób ciągły znajduje się w kontakcie ze środowiskiem zewnętrznym poprzez komórki nabłonkowe błon śluzowych oraz skórę, co jest konieczne dla zachowania procesów życiowych, z drugiej zaś strony może stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia. Interakcja człowieka ze środowiskiem zewnętrznym rozpoczyna się już w momencie narodzin. Pierwotnie jałowy noworodek kontaktuje się ze środowiskiem podczas porodu i jest to moment wnikięcia drobnoustrojów na skórę, śluzówki przewodu pokarmowego oraz układu moczowo-płciowego. Źródłem drobnoustrojów kolonizujących noworodka jest mikroflora dróg rodnych matki, skóra osób odwiedzających, usta oraz nosogardziel osób pozostających w bezpośrednim kontakcie oraz drobnoustroje ze środowiska jak również rodzaj pokarmu jakim żywione są noworodki. Istotną sprawą jest sposób porodu czy to silami natury czy poprzez cesarskie cięcie.

Dlatego temat podjęty przez Doktorantkę jest tematem ważnym i zapewne wymagającym ciągłej weryfikacji i analizy z powodu ciągłego wzrostu identyfikacji bakterii stanowiących mikrobiom głównie w aspekcie sposobu porodu jak i sposobu żywienia noworodka (mleko matki, pokarmy sztuczne).

Jr hab. n. med. Aleksandra
Kasperczyk, prof. SUM
tel.: (+48 32) 272 23 18

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 272 23 18
fax: (+48 32) 272 23 18

biochemz@sum.edu.pl

Charakterystyka ogólna pracy

Rozprawa liczy 142 strony i składa się wykazu skrótów, oraz następujących rozdziałów: wstępu, celów pracy, materiałów i metodyki badań, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwa (204 pozycji) spisu tabel (23) i rycin (12). Na końcu jest dołączona ankieta oraz zgoda Komisji Bioetycznej. Praca jest przejrzysta i starannie sformatowana.

Wstęp

Stanowi ponad jednostronicowe wprowadzenie do rozdziału pt. „Mikrobiom człowieka”, który jest pierwszą częścią pracy. Rozdział ten został podzielony na trzy podrozdziały i stanowi 42 strony maszynopisu. W pierwszym podrozdziale Doktorantka skupiła się na rozwoju mikroflory jelitowej - na czynnikach wpływających na jej rozwój na konsekwencjach zdrowotnych w przypadku jej zaburzeń. Ponadto zawarła informacje na temat czynników, które mogą zakłócać kolonizację noworodka. W drugim podrozdziale zostały podane informacje dotyczące aspektu karmienia piersią, m.in. korzyści płynące z tego rodzaju karmienia noworodków, składu mleka kobiecego oraz sposobu karmienia w aspekcie kolonizacji noworodka. Ostatni podrozdział zawiera informację dotyczącą sposobu porodu jako czynnika wpływającego na zdrowie dziecka.

Rozdział ten stanowi bardzo ciekawe i wyczerpujące opracowanie, które może być wykorzystane do napisania pracy poglądowej. Doktorantka w bardzo ciekawy sposób zaznajomiła czytelnika z bakteriami kolonizującymi organizm człowieka.

Cel pracy

Głównym celem pracy Doktorantki była ocena stopnia zasiedlenia górnego odcinka przewodu pokarmowego mikroflorą bakteryjną w grupie noworodków urodzonych drogami natury i drogą cięcia cesarskiego. Postanowiła go zrealizować za pomocą trzech celów szczegółowych, m.in. poprzez ocenę stopnia zasiedlenia górnego odcinka przewodu pokarmowego noworodków - sprawdzenie, czy droga porodu ma wpływ na ilość bakterii tam zidentyfikowanych. Następnie - analizę składu mikroflory górnego odcinka przewodu pokarmowego noworodków celem ustalenia, czy sposób zakończenia ciąży jest czynnikiem związanym z występowaniem określonych bakterii oraz czy sposób karmienia noworodka w pierwszych dniach po porodzie ma wpływ na ilościową kolonizację górnego odcinka przewodu pokarmowego.

W mojej opinii cel główny jak i cele szczegółowe zostały prawidłowo postawione.





Material i Metody

Rozdział ten stanowi 16 stron maszynopisu. W projekcie badawczym na który uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej 887/17 przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu brało udział 100 noworodków od których pobierano wymazy z jamy ustnej w 1, 2 i 3 dobie życia. Podziału na dwie podgrupy dokonano na podstawie sposób porodu: przez cięcie cesarskie oraz siłami natury. Następnie dokonano podziału noworodków na dwie kolejne podgrupy w zależności od sposobu karmienia: karmienie wyłącznie piersią oraz noworodki karmione w sposób mieszany - pierś i mieszanka sztuczna. Doktorantka włączyła do tej ostatniej podgrupy dwoje niemowląt karmionych wyłącznie mieszanką sztuczną. Na podstawie opracowanej ankiety składającej się z 20 pytań przeprowadziła charakterystykę kliniczną grupy badanej z podziałem: na pacjentki po porodzie drogą cięcia cesarskiego oraz po porodzie siłami natury. Wszystkie dane wynikające z powyższych podziałów grupy badanej Doktorantka przedstawiła w trzech tabelach. W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę grupy badanej.

Od 56 strony Doktorantka opisuje metodę badawczą: pobranie wymazów, izolację DNA, parametry związane z reakcją qPCR oraz analizę statystyczną.

Uwaga:

- brak informacji dotyczącej miejsca poboru próbek materiału od noworodków (klinika, szpital miejski?),
- tabele od 1 do 3 wraz z opisem powinny się znaleźć w części wynikowej,
- brak opisu metody qPCR,
- podział tego rozdziału na podrozdziały byłby bardziej czytelniejszy.

Wyniki

Do opracowania wyników, które Doktorantka przedstawiła w 15 tabelach i na 10 rycinach użyła pakietu statystycznego PQStat. Wszystkie testy niniejszego opracowania zostały dobrane prawidłowo.

Wykazano istotną statystycznie różnicę w tygodniu rozwiązania ciąży pomiędzy grupą pacjentek rodzących drogą cięcia cesarskiego a siłami natury.

Analizując DNA bakterii *Lactobacillus spp.* w wymazach z jamy ustnej noworodków, wyrażony wartościami MoM Doktorantka wykazała istotnie

J. Kasz.

Uwaga:

-Doktorantka podała wartość p do sześciu miejsc po przecinku co jest mało czytelne. Powinna być podana do trzech miejsc.

Dyskusja i wnioski

Dyskusja jest napisana poprawnie. Autorka porównuje wyniki własne z innymi badaczami. Podkreśla w niej jak ogromną rolę w rozwoju prawidłowej flory bakteryjnej ma sposób porodu, rodzaju spożywanego pokarmu w okresie noworodkowym i niemowlęcym, a także czynników z okresu prenatalnego, w tym stan kobiety ciężarnej. Mikrobiota kobiety ciężarnej zmienia się wraz z rozwojem ciąży przeważają wtedy bakterie z rodzaju *Lactobacillus* dlatego flora bakteryjna noworodków urodzonych siłami natury przypominać będzie florę bakteryjną spotykaną u matki. Ważnym aspektem jest karmienie mlekiem matki przez co mikrobiota przewodu pokarmowego noworodka będzie zasiedlona bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, w przeciwieństwie do dzieci karmionych mieszanką sztuczną, u których będą przeważały bakterie *Bacteroides* i *Clostridium*.

Wnioski zostały sformułowane prawidłowo i odpowiadają celom pracy.

Piśmiennictwo

Dołączone piśmiennictwo jest prawidłowo cytowane. Składa się z 204 pozycji z czego z ostatnich pięciu lat stanowi 36%.

Rozprawę zamykają streszczenia w języku polskim oraz angielskim, przedstawiające skrótowo założenia pracy oraz uzyskane wyniki.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja zawiera oryginalną i nowatorską koncepcję naukowo-badawczą. Ponadto świadczy o doskonałym warsztacie Doktorantki umiejętności wyciągania kluczowych wniosków na podstawie uzyskanych wyników. Wymienione wyżej uwagi w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości i oryginalności dysertacji i są jedynie wskazówkami do dalszych publikacji.

Przedstawiona praca w pełni odpowiada kryteriom stawianym przed kandydatami do stopnia doktora, spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

A. K.

statystycznie wyższy ich poziom w kolejnych dobach (pierwsza, druga, trzecia) u dzieci urodzonych siłami natury w stosunku do dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego. Natomiast analiza wariancji nie potwierdziła istotnej statystycznie zmiany względnego poziomu bakterii *Lactobacillus* w wymazach z jamy ustnej noworodków pozyskanych w kolejnych dobach od dzieci urodzonych siłami natury jak również drogą cięcia cesarskiego.

DNA *Bifidobacterium I* (amplikon I) jak i *Bacteroides I i II* w wymazach z jamy ustnej noworodków, wyrażony wartościami MoM, w kolejnych dobach u dzieci urodzonych siłami natury nie różnił się w sposób istotny statystycznie w stosunku do dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego. Analiza wariancji potwierdziła istotnie statystycznie zmiany względnego poziomu DNA bakterii *Bifidobacterium I* (amplikon I) w wymazach z jamy ustnej noworodków pozyskanych w kolejnych dobach od dzieci urodzonych siłami natury. Takiej zależności nie wykazano u dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego. W przypadku *Bacteroides I i II* analiza wariancji nie potwierdziła istotnej statystycznie zmiany względnego poziomu bakterii *Bacteroides I* (amplikon I) w wymazach z jamy ustnej noworodków pozyskanych w kolejnych dobach od dzieci urodzonych siłami natury jak i drogą cięcia cesarskiego.

Doktorantka wykazała, że względny poziom bakterii *Bifidobacterium II* (amplikon II) w wymazach z jamy ustnej noworodków, wyrażony wartościami MoM, był istotnie statystycznie wyższy w kolejnych dobach u dzieci urodzonych siłami natury w stosunku do dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego. Natomiast analiza wariancji powtarzanych pomiarów nie potwierdziła istotnej statystycznie zmiany względnego poziomu bakterii *Bifidobacterium II* (amplikon II) w wymazach z jamy ustnej noworodków pozyskanych w kolejnych dobach od dzieci urodzonych siłami natury.

Po dokonaniu analizy poziomu DNA bakterii *Lactobacillus spp.* w wymazach z jamy ustnej noworodków w zależności od sposobu karmienia w poszczególnych dobach Doktorantka nie wykazała istotnie różnic w kolejnych dobach u dzieci karmionych wyłącznie piersią w stosunku do dzieci karmionych w sposób mieszany. Podobne zależności wykazano we wszystkich pozostałych analizowanych przez Doktorantkę wariantach.

W żadnej z pobranych próbek, zarówno u noworodków urodzonych siłami natury jak i drogą cięcia cesarskiego, nie wykryto bakterii z rodzaju *Escherichia coli*.

Wykazano nieznaczną liczebność bakterii *Clostridium difficile* w wymazach u noworodków urodzonych za pomocą cięcia cesarskiego i karmionych wyłącznie mieszanką.

J. Kozłowski

Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

W związku z tym mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady
Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Renaty
Witkowskiej - Wirstlein do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Biochemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
A. Kasprzak
dr hab. n. med. Aleksandra Kasprzak, prof. SUM