



CENTRUM ZDROWIA DZIECKA

Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa
T: 22 815 70 00; F: 22 815 15 10
www.czd.pl

INSTYTUT
"Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka"
ZAKŁAD PATOLOGII
04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20
tel 22 815-19-60; fax 22 815-19-75
Regon 000557961; NIP 952-11-43-675
L/ZPA

Warszawa, 10.08.2019

**Ocena rozprawy doktorskiej lekarza Macieja Kołodzieja
pt.: „Modyfikacje mikrobioty przewodu pokarmowego w trakcie
antybiotykoterapii u dzieci ”**

Antybiotykoterapia staje się ogromnym problemem i wyzwaniem medycyny XXI wieku. Z jednej strony prowadzi do powstawania i rozprzestrzeniania się mikroorganizmów antybiotykoopornych, z drugiej odpowiedzialna jest za zaburzenia składu mikrobioty zasiedlającej fizjologicznie organizm człowieka, powodując tzw. dysbiozę. Dysbioza jelitowa określana jako zaburzenie składu i funkcji najliczniejszej mikrobioty zlokalizowanej w przewodzie pokarmowym (głównie w jelitach) może prowadzić nie tylko do rozwoju biegunek związanych z antybiotykoterapią, ale również może wpływać na aktywację procesów immunologicznych indukujących choroby o podłożu alergicznym, autoimmunizacyjnym, czy też doprowadzać do nieprawidłowości w działaniu osi mikrobiota-jelita-mózg. Hipoteza mikrobiotyczna rozwoju niezakaźnych chorób przewlekłych wiąże się również z tzw. programowaniem mikrobiotycznym, czyli wpływem mikrobioty jelitowej na rozwój równowagi immunologicznej Th1/Th2 i tolerancji na antygeny zewnętrzne w okresie kształtowania mikrobiomu jelitowego, tzn. we wczesnej ontogenezie, co może wpływać na rozwój przewlekłych chorób w dalszym życiu dziecka.



Probiotyki – mikroorganizmy korzystnie wpływające na zdrowie gospodarza mogą modulować skład mikrobiomu jelitowego, ale ich działanie jest szczepozależne i efektów prozdrowotnych jednych szczepów nie można przenosić na inne szczepy. Niestety, chociaż obecnie producenci probiotyków często powołują się na badania potwierdzające korzyści stosowania probiotyków, jednak ze względu na brak badań swoich produktów, głównie odnoszą się do gatunków, a nie do konkretnych szczepów. Dlatego temat pracy wybrany przez Doktoranta i Promotorkę prof. Hannę Szajewską uważam za bardzo aktualny i niezmiernie ważny aplikacyjnie. Tego rodzaju prace przyczyniają się do tworzenia standardów stosowania probiotyków.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z cyklu 3 prac opublikowanych w czasopismach o wysokim wskaźniku „impact factor” (IF). Sumaryczny IF z wszystkich prac wynosi 11,959. We wszystkich opublikowanych pracach Doktorant był pierwszym autorem i miał znaczny wkład, potwierdzony załączonym do rozprawy doktorskiej oświadczeniem Promotorki prof. Hanny Szajewskiej.

Dwie prace (opublikowane w *BMJ Open* w 2018 (IF=2,376) i *Clinical Microbiology and Infection* w 2019, IF=6.425) tworzą spójną całość i opisują przeprowadzone badanie oceniające skuteczność szczepu probiotycznego *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 w zapobieganiu bieguncie związanej z antybiotykoterapią u dzieci. W pierwszej pracy opublikowano protokół badania i metodykę, w drugiej przeprowadzono analizę uzyskanych wyników badań.

Trzecia praca opublikowana w *Archives of Diseases in Childhood* w 2019 roku (IF=3,158) to przegląd systematyczny badań oceniających wpływ antybiotykoterapii stosowanej w okresie przed- i poporodowym na ryzyko wystąpienia celiakii lub autoimmunizacji celiakalnej u dzieci.

Rozprawę rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim, następnie we wstępie Doktorant przedstawia dane literaturowe dotyczące mikrobioty przewodu pokarmowego, czynników wpływających na skład mikrobioty jelitowej oraz metod jej

modyfikacji ze szczególnym uwzględnieniem probiotyków i wskazań klinicznych do ich stosowania u dzieci. W tej części pracy szczegółowo scharakteryzowano szczep *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 użyty do badań klinicznych oraz przedstawiono niekorzystne efekty działania antybiotyków skupiając się na antybiotykooporności i bieguncie związanej z antybiotykoterapią. Omówiono również wpływ antybiotykoterapii na ryzyko wystąpienia chorób przewlekłych. Wstęp pokazuje dużą wiedzę Doktoranta, ale w tej części zabrakowało mi informacji wyjaśniających w jaki sposób antybiotykoterapia wpływa na mikrobiom jelitowy. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić czym charakteryzuje się dysbioza powstała na skutek stosowania antybiotyków? Prosiłaby również o wytłumaczenia dlaczego Doktorant zdecydował się na wybór szczepu *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 do badań klinicznych. Pytanie o wybór szczepu probiotycznego jest tym bardziej zasadne, gdyż w tabeli 4 przedstawiającej skuteczność *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 pokazano, że szczep ten jest nieskuteczny w zapobieganiu bieguncie związanej z antybiotykoterapią, co również zostało udowodnione przez Doktoranta w publikacji będącej elementem pracy doktorskiej.

Po przedstawieniu celów w rozdziale 2, rozdział 3 to załączone publikacje. Ze względu na fakt, że wszystkie prace były recenzowane przez wybitnych ekspertów w danej dziedzinie nie widzę potrzeby szczegółowego ich omawiania w mojej recenzji, jednak mam kilka uwag i pytań do Doktoranta.

Pierwsze dwie publikacje dotyczą badania z randomizacją, metodą podwójnie ślepej próby, do którego włączono 250 dzieci w wieku poniżej 18 lat, które otrzymywały antybiotyk dowolną drogą. Dzieci zostały losowo przydzielone do grupy otrzymującej probiotyk lub do grupy otrzymującej placebo. W obu grupach interwencja trwała przez cały okres antybiotykoterapii, a czas obserwacji wynosił jeden tydzień od jej zakończenia. Przeprowadzona analiza pokazała podobną częstość występowania biegunki związanej z antybiotykoterapią (pierwotny punkt końcowy badania) w obu grupach. W podrozdziale artykułu opublikowanego w *Clin Microbiol Infect* 2019 pt. „Strengths and limitations of the study” zaznaczono, że głównym

ograniczeniem badania jest krótki okres obserwacji (zaledwie jeden tydzień), podczas gdy biegunka poantybiotykowa może rozwinąć się nawet po 2 miesiącach od zakończonej antybiotykoterapii. Chciałabym zwrócić uwagę również na inny aspekt – długość podawania probiotyku. Czy biorąc pod uwagę fakt, że biegunka (najprawdopodobniej spowodowana dysbiozą) może rozwinąć się dopiero po 2 miesiącach, czy podawanie probiotyków ograniczone do czasu antybiotykoterapii jest słuszne? Czy nie powinno być wydłużone? Czy znane są Doktorantowi badania, w których porównywano efektywność probiotyków w zależności od czasu stosowania probiotyku oraz badania pokazujące zależność czasową pomiędzy antybiotykoterapią a momentem pojawienia się dysbiozy? Czy w takim razie biorąc pod uwagę te dosyć istotne ograniczenia badania (zbyt krótki czas obserwacji i czas stosowania probiotyku ograniczony do czasu antybiotykoterapii) można stwierdzić, że szczep *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 nie jest skuteczny w zapobieganiu biegunce poantybiotykowej? Zawsze, gdy uzyskuje się negatywny wynik zachodzi pytanie, czy w tak zaplanowanym badaniu nie powinno się mieć kontroli pozytywnej (podobnie jak w badaniach eksperymentalnych), czyli grupy, której podaje się probiotyk o udowodnionym pozytywnym działaniu, co oczywiście jest utrudnione w badaniach klinicznych, ale nie niemożliwe.

Publikacja 3 to przegląd systematyczny badań dotyczących wpływu antybiotykoterapii we wczesnym okresie życia dziecka na rozwój celiakii lub celiakalnej autoimmunizacji (obecności autoprzeciwciał swoistych dla celiakii). Przegląd badań obserwacyjnych pozwolił na wyłonienie 6 publikacji: 2 dotyczących prenatalnego stosowania antybiotyków i 4 związanych z postnatalną antybiotykoterapią. Wg mnie wniosek postanowiony na podstawie analizy tak małej liczby publikacji powinien być bardziej wyważony, co prawda autorzy tej publikacji zastrzegają się, że nadal konieczne są badania w tym zakresie, gdyż dopiero zwiększenie liczby badań obserwacyjnych, zwłaszcza dużych kohort pozwoli na ocenę wpływu antybiotykoterapii w okresie rozwoju mikrobiomu jelitowego na rozwój celiakii – jednej z najczęstszych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. Przykładem

takiej pracy, której autorzy nie ujęli w opublikowanym przeglądzie jest badanie kohortowe przeprowadzone w Danii i Norwegii, które ukazało się w marcu 2019 roku (Autorzy przeglądu analizowali prace opublikowane do końca roku 2018) – Dydensborg Sander et al, *Gastroenterology*. 2019 Mar 2. pii: S0016-5085(19)32507-7. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.039. Analiza przeprowadzona przez Dydensborg Sander i wsp. wykazała pozytywną korelację pomiędzy antybiotykoterapią w pierwszym roku życia a rozwojem celiakii (OR =1.26, 95% CI 1.16-1.36). Autorzy tego badania obserwowali również, że wyższa liczba antybiotykoterapii skutkowała wyższym ryzykiem rozwoju celiakii. Moje pytanie do Doktoranta nawiązujące do tej obserwacji brzmi – czy nie należałoby analizować wpływu współwystępowania innych czynników modulujących mikrobiom w okresie jego rozwoju, nie tylko antybiotykoterapii, jej liczby, ale również rodzaju porodu, przebytych infekcji, a nawet liczby rodzeństwa?

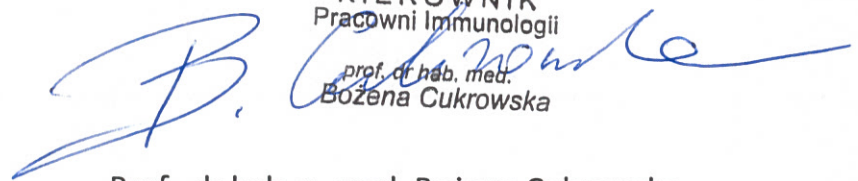
Pytania, które zawarte są w mojej recenzji wynikają między innymi z tego, że w rozprawie doktorskiej zabrakowało kompleksowej dyskusji uzyskanych wyników (co prawda taka dyskusja jest w każdym załączonym artykule, ale najczęściej z powodów redakcyjnych jest ona ograniczona). Rozprawę doktorską kończy jedynie podsumowanie wyników zaprezentowanych w artykułach (które w dużej mierze pokrywa się ze streszczeniem rozprawy) oraz wnioski z badania z randomizacją oraz przeglądu systematycznego badań, które nie potwierdzają tezy, że wybrany probiotyk chroni dzieci przed biegunką związaną z antybiotykoterapią oraz istnieje zależność pomiędzy rozwojem celiakii a antybiotykoterapią we wczesnej ontogenezie pre- i postnatalnej.

W podsumowaniu swojej recenzji chciałabym podkreślić wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej, wnoszącą znaczący wkład m.in. w tworzenie standardów stosowania probiotyków. Doktorantowi z powodzeniem udało się przedstawić 3 artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim wskaźniku IF jako rozprawę doktorską, która w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i

tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2019; przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1669 z późn. zm.)

Przedkładam zatem Radzie Naukowej I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza Macieja Kołodzieja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość naukową włączonych publikacji, które po przejściu recenzji międzynarodowych ekspertów zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o wysoki wskaźniku IF uważam, że rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie.


KIEROWNIK
Pracowni Immunologii
prof. dr hab. med.
Bożena Cukrowska

Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska