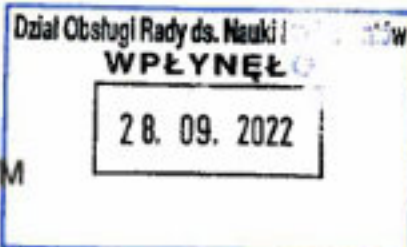




UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

dr hab. n. med. Elżbieta Jarocka-Cyrta, prof. UWM
Kierownik Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia

WOJEWÓDZKI SPECJALISTYCZNY SZPITAL DZIECIĘCY W OLSZTYNIE
IM. PROF. DR STANISŁAWA POPOWSKIEGO
ul. Żołnierska 18 a, 10-561 Olsztyn tel. 89 539 34 62



Olsztyn, 12 września 2022 r.

***Ocena rozprawy doktorskiej lekarza Jana Łukasika zatytułowanej:
„Probiotyki w zapobieganiu działaniom niepożądanym antybiotykoterapii
u dzieci”.***

Antybiotyki należą do najczęściej przepisywanych leków, jednak ich stosowanie wiąże się z wystąpieniem niepożądanych reakcji klinicznych, zaburzeniem składu mikroorganizmów zasiedlających przewód pokarmowy oraz selekcją mikroorganizmów opornych na antybiotyki. Najczęstszym i najlepiej udokumentowanym następstwem antybiotykoterapii jest biegunka. Ryzyko wystąpienia biegunki związanej z antybiotykoterapią (AAD) może zmniejszyć zastosowanie probiotyków. Prawidłowo przeprowadzone badania kliniczne wskazują na umiarkowaną skuteczność wybranych szczepów probiotycznych, jednak w praktyce obserwujemy dużą dowolność przy wyborze konkretnego produktu przez lekarzy i rodziców. Dotychczas w większości badań oceniano skuteczność pojedynczych szczepów probiotycznych, wyjątkowo probiotyków dwugatunkowych. Skuteczność probiotyków wielogatunkowych i wieloszczepowych nie była przedmiotem badań u dzieci.

W związku z powyższym temat badań podjętych przez lekarza Jana Łukasika jest bardzo ważny w aspekcie racjonalnego stosowania probiotyków w zapobieganiu biegunce związanej z antybiotykoterapią.

Rozprawa doktorska jest wynikiem wieloletniego zainteresowania Doktoranta problematyką mikrobioty jelitowej i metod jej modyfikacji. Kluczowe jest świetne przygotowanie merytoryczne do zaplanowanych badań, czego dowodem są liczne artykuły współautorstwa Doktoranta opublikowane w najlepszych czasopismach medycznych.



WYDZIAŁ LEKARSKI/COLLEGIUM MEDICUM
UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
KLINIKA PEDIATRII, GASTROENTEROLOGII I ŻYWIENIA

Ocena formalna

W skład rozprawy doktorskiej lekarza Jana Łukasika wchodzi trzy przykładowe opracowane artykuły opublikowane w międzynarodowych recenzowanych czasopismach: 1/protokół badania, 2/praca oryginalna, 3/przegląd systematyczny o łącznej imponującej punktacji współczynnika oddziaływania IF=21,82.

1. Łukasik J., Szajewska H.: Effect of a multispecies probiotic on reducing the incidence of antibiotic-associated diarrhoea in children: a protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open*, 2018; 8(5): 1-7 (IF 2,38);
2. Łukasik J., Dierikx T., Besseling-van der Vaart I., de Meij T., Szajewska H., on behalf 2. of the Multispecies Probiotic in AAD Study Group: Multispecies probiotic for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *JAMA Pediatrics*, 2022; accepted (IF 16,2);
3. Łukasik J., Guo Q., Boulos L., Szajewska H., Johnston B.C.: Probiotics for the prevention of antibiotic-associated adverse events in children – a scoping review to inform development of a core outcome set. *PLoS One*, 2020; 15(5): e0228824. (IF 3,24).

Rozprawa ma układ wymagany dla prac doktorskich prezentowanych w formie cyklu publikacji, liczy z piśmiennictwem i załącznikami 106 stron. W jej skład wchodzi kolejno: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, kopie publikacji, podsumowanie i wnioski.

Pracę uzupełniają: spis treści i użytych w tekście skrótów, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wykaz piśmiennictwa omawianego we wstępie oraz zgoda Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym na prowadzenie zadania badawczego. Cytowane piśmiennictwo zawiera 173 pozycje, są to prace oryginalne, poglądowe i metaanalizy, w większości pochodzące z ostatnich 10 lat.

Lektura rozprawy doktorskiej lekarza Jana Łukasika, mimo iż podyktowana obowiązkami recenzenta, sprawiła mi wielką przyjemność. Wstęp rozprawy napisany został bardzo precyzyjnym językiem naukowym z jednoczesnym zachowaniem pięknej polszczyzny. Stanowi doskonały przykład połączenia swobody pisania wynikającej z dogłębnej znajomości poruszanych zagadnień oraz literackich predyspozycji Autora, tak cenionych u osób zajmujących się pracą naukową.

Ocena merytoryczna

Pierwsza część pracy stanowi wprowadzenie teoretyczne do przeprowadzonych badań. Doktorant z doskonałą znajomością tematu przedstawia najnowsze informacje dotyczące mikrobioty przewodu pokarmowego, charakteryzuje prawidłowy skład mikrobioty jelitowej, czynniki wpływające na jej równowagę oraz przyczyny i następstwa dysbiozy. Przedstawia możliwości modyfikacji mikrobioty, analizuje obecną wiedzę dotyczącą niepożądanych następstw antybiotykoterapii, w tym biegunki związanej z antybiotykoterapią oraz ryzyka wystąpienia chorób przewlekłych. Przedstawia definicję AAD, potencjalne patomechanizmy i czynniki ryzyka sprzyjające jej wystąpieniu oraz odrębności przebiegu w populacji pediatrycznej. W kolejnych podrozdziałach wskazuje na potencjalną rolę probiotyków w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia tego powikłania antybiotykoterapii. Definiuje pojęcie probiotyków wielogatunkowych i wieloszczepowych, podkreślając potrzebę oceny skuteczności każdego z probiotyków w konkretnej sytuacji klinicznej.

Na szczególne podkreślenie zasługuje przeprowadzona przez Autora analiza problemów metodologicznych, jakie spotykamy w badaniach klinicznych nad rolą probiotyków w zapobieganiu AAD. Doktorant zauważa dużą rozbieżność protokołów badań, braku jednolitego określenia AAD, heterogenność punktów końcowych przyjętych przez badaczy. Podkreśla konieczność ostrożnej interpretacji badań obserwacyjnych szczególnie w ich aplikacji klinicznej, zwracając uwagę na błędy jakimi mogą być obarczone takie badania. O bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia działalności naukowej świadczą rozważania o znaczeniu prawidłowo sformułowanego pytania klinicznego w badaniach interwencyjnych oraz prawidłowo zdefiniowanego, prawidłowo zmierzonego i zraportowanego punktu końcowego w uzyskaniu wiarygodnych i przydatnych klinicznie wyników.

Autor postawił sobie następujące cele badawcze:

1. ocena skuteczności probiotyku wielogatunkowego w zapobieganiu biegunce związanej z antybiotykoterapią u dzieci;
2. systematyczna dokumentacja i ocena metodologiczna punktów końcowych raportowanych w istniejących badaniach na temat stosowania probiotyków w trakcie antybiotykoterapii u dzieci.

Cele pracy są jasno zdefiniowane, problemy aktualne i ważne z punktu widzenia potencjalnej aplikacji klinicznej.

Na podstawie rzetelnej pracy badawczej, analizy dostępnych danych, w oparciu o warsztat naukowy rozwijany przez lata pod nadzorem prof. Hanny Szajewskiej, Doktorant przygotował protokół badania klinicznego, a następnie zgodnie z protokołem, przeprowadził badania dotyczące oceny skuteczności probiotyku wielogatunkowego w zapobieganiu biegunce związanej z antybiotykoterapią u dzieci.

Doktorant zaplanował prospektywne wieloośrodkowe badanie z randomizacją metodą poczwórnie ślepej próby. Taki model badania uważany jest za najbardziej odpowiedni do weryfikacji hipotez badawczych. Doktorant zdefiniował pierwszorzędowy punkt końcowy i punkty drugorzędowe, scharakteryzował kryteria włączenia i wykluczenia, oszacował niezbędną liczbę pacjentów. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowany sposób zaślepienia, w którym alokacja do grupy nie jest znana na żadnym etapie łącznie z etapem opracowania wyników. Protokół badania został opublikowany i włączony do prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

W kolejnym etapie Doktorant oceniał skuteczność probiotyku wielogatunkowego zawierającego 8 szczepów bakterii (*Bifidobacterium bifidum* W23, *Bifidobacterium lactis* W51, *Lactobacillus acidophilus* W37, *Lactobacillus acidophilus* W55, *Lactocaseibacillus paracasei* W20, *Lactiplantibacillus plantarum* W62, *Lactocaseibacillus rhamnosus* W71 i *Ligilactobacillus salivarius* W24) w zapobieganiu biegunce związanej z antybiotykoterapią u dzieci. Badaniem objęto 350 dzieci w wieku od 3miesiący do 18 lat (dwa ośrodki z Polski i cztery z Niderlandów). Uczestnicy otrzymywali probiotyk w dawce 10 miliardów jednostek tworzących kolonie na dobę lub placebo przez okres antybiotykoterapii i przez 7 kolejnych dni. Pierwszorzędom punktem końcowym była biegunka związana z antybiotykoterapią, zdefiniowana jako co najmniej 3 luźne lub wodniste stolce na dobę w okresie 24 godzin, wywołane przez *C. difficile* lub o nieustalonej etiologii (po wykluczeniu czynników infekcyjnych). Badanie wykazało, że wielogatunkowy probiotyk zastosowany w badaniu nie redukował ryzyka wystąpienia biegunki związanej z antybiotykoterapią. W grupie otrzymującej badany probiotyk stwierdzono istotnie mniejsze całkowite ryzyko biegunki ocenianej niezależnie od etiologii (drugorzędowy punkt końcowy). Wyniki zostały przedstawione w formie pracy

oryginalnej, wchodzącej w skład rozprawy. O jakości przeprowadzonych badań i wartości wyników najlepiej świadczy fakt, iż praca ukazała się w jednym z najbardziej prestiżowych czasopism medycznych.

Trzecią część rozprawy stanowi przegląd piśmiennictwa (ang. Scoping Review) dokumentujący punkty końcowe przyjęte w badaniach dotyczących stosowania probiotyków w trakcie leczenia antybiotykami u dzieci. Na podstawie analizy wyselekcjonowanych zgodnie z przyjętą procedurą 37 badań, autor stwierdza dużą heterogenność punktów końcowych w tym brak jasno zdefiniowanego rozpoznania AAD, rzadko oceniane: czas trwania biegunki, ciężkość przebiegu oraz jakość życia pacjentów. Obserwacje te stanowią podstawę do przygotowania prawidłowo zaplanowanych badań dotyczących roli probiotyków w zapobieganiu AAD.

Bardzo istotne jest włączenie do rozprawy, oprócz publikacji, także suplementu zawierającego szczegółowy opis strategii przeszukiwania baz danych, charakterystykę publikacji włączonych i wykluczonych z analizy. Należy podkreślić, że przygotowanie takiego przeglądu wymaga dużego nakładu pracy, systematyczności i umiejętności działania w zespole.

Efekty swojej pracy Doktorant ujął w formie trzech wniosków:

1. W przeprowadzonym badaniu z randomizacją metodą poczwórnie ślepej próby z placebo wykazano skuteczność probiotyku wielogatunkowego w zmniejszaniu całkowitego ryzyka biegunki, niezależnie od jej etiologii, w trakcie antybiotykoterapii i przez 7 kolejnych dni. Tak zdefiniowany punkt końcowy lepiej oddaje pragmatyczne podejście przyjęte w praktyce klinicznej niż konserwatywna definicja AAD. Na podstawie wyników badania można rozważać zastosowanie badanego probiotyku w trakcie antybiotykoterapii u dzieci.
2. Punkty końcowe w badaniach dotyczących stosowania probiotyków w trakcie antybiotykoterapii u dzieci są heterogenne oraz rzadko uwzględniają perspektywę pacjenta. Wyniki przeglądu systematycznego uzasadniają potrzebę stworzenia zestawu podstawowych punktów końcowych dedykowanych tej tematyce.
3. Oceniane łącznie wnioski obu badań demonstrują istotność definicji punktu końcowego dla interpretacji wyników badań klinicznych dotyczących stosowania probiotyków w trakcie antybiotykoterapii.

Po lekturze pracy nasuwają się pewne uwagi.

1. W trakcie prowadzenia badania, w związku z niezadawalającą liczbą zrekrutowanych pacjentów, Doktorant dokonał dwóch zmian w protokole: zwiększył liczbę ośrodków biorących udział w badaniu i obniżył wiek badanej grupy do 3 miesięcy. O ile pierwsza zamiana była przewidziana w protokole, a udział kilku ośrodków podnosi znaczenie uzyskanych wyników, to obniżenie granicy wieku zmienia charakterystykę badanej populacji i implikuje liczne następstwa, co wymaga omówienia. W projekcie badawczym nie znajdujemy wyjaśnienia, dlaczego Autor pierwotnie ustalił limit wieku na 6 miesięcy - czy decydowały o tym względy organizacyjne czy merytoryczne? Obniżenie granicy do 3 miesięcy skutkowało zwiększeniem odsetka niemowląt pośród zrekrutowanych uczestników. Analizując charakterystykę pacjentów, możemy zauważyć, iż połowa z nich nie przekroczyła 28 miesięcy. Jak wynika z publikacji niski wiek pacjentów wiąże się ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia AAD jak i infekcji wirusowych przewodu pokarmowego.

Można przypuszczać, że dzieci w wieku 3-6 miesięcy w wielu przypadkach karmione były w sposób mieszany, to znaczy, że otrzymywały także pokarm naturalny. Ten sposób karmienia mógł być czynnikiem modyfikującym podatność na infekcje i występowanie AAD. W pracy nie znajduję informacji dotyczących sposobu karmienia niemowląt.

2. Wielu autorów zajmujących się problematyką biegunk u niemowląt podkreśla trudności związane z oceną liczby stolców u pieluchowych pacjentów. Zgodnie z pierwszorzędowym punktem końcowym i drugorzędowymi punktami końcowymi w badaniu Doktoranta o rozpoznaniu AAD, łagodnej AAD i ciężkiej AAD, a także biegunki bez względu na etiologię, decydowała liczba stolców w określonym przedziale czasu, bez względu na ich objętość. Biorąc pod uwagę trudności w określeniu rzeczywistej liczby oddanych stolców u niemowlęcia 3-6 miesięcznego (ocenia się ilość zmienionych pieluszek, a nie liczbę wypróżnień) kwalifikacja pacjenta do grup AAD mogła być obarczona dużym błędem.

3. Objawy niepożądane występujące u dzieci leczonych antybiotykami i otrzymujących prebiotyki odzwierciedlają raczej powikłania antybiotykoterapii niż stosowania probiotyku. W badaniu Doktoranta zwraca uwagę niski, w porównaniu z innymi pracami, odsetek pacjentów demonstrujących objawy niepożądane, szczególnie ból brzucha. Czy nie jest to wynikiem nieprawidłowej kwalifikacji tych objawów ze względu na zróżnicowanie wiekowe pacjentów (3 miesiące - 18 lat)? Biorąc pod uwagę duży udział najmłodszych dzieci może należało zastosować w ich przypadku inne narzędzie np. Infant Gastrointestinal Symptoms Questionnaire (IGSQ)?
4. Efekt działania probiotyku zależy między innymi od dawki, wyższe dawki w pewnym zakresie wykazują lepszą skuteczność. Jednocześnie dostępne preparaty dla dzieci zazwyczaj zawierają zredukowaną dawkę w stosunku do dorosłych. W badaniu Doktorant zastosował 1×10^9 CFU (jednostek formujących kolonie) na dobę. Czy zastosowanie tej samej dawki probiotyku u 4 miesięcznego dziecka (6 kg) i 17 (50 kg) pozostaje bez wpływu na uzyskane wyniki?
5. Zgodnie z tabelą 1. do badania zakwalifikowano także pacjentów leczonych antybiotykiem z powodu infekcji przewodu pokarmowego. Biegunka jest częstym objawem w przebiegu tych schorzeń, co w mojej opinii przemawia za wykluczeniem tej grupy z badania.
6. Największe moje zastrzeżenia budzą wnioski przedstawione przez Doktoranta. Pierwszym celem pracy doktorskiej była ocena skuteczności probiotyku wielogatunkowego w zapobieganiu biegunce związanej z antybiotykoterapią u dzieci. Realizacja tego celu wymagała opracowania protokołu i przeprowadzania wieloośrodkowego badania, będącego najważniejszą częścią rozprawy. Pierwszorzędowym punktem końcowym było wystąpienie biegunki związanej z antybiotykoterapią definiowanej jako 3 lub więcej luźnych stolców na dzień w okresie 24 godzin, wywołanych przez *C. difficile* lub o nieokreślonej etiologii, po wykluczeniu czynników infekcyjnych. Wyniki badania jednoznacznie wskazują na brak efektu ochronnego badanego probiotyku wielogatunkowego na występowanie AAD u dzieci. I taki też główny wniosek przedstawiono w publikacji wchodzącej

w skład rozprawy. Odpowiadał on celom pracy. Natomiast w rozprawie Doktorant nie uwzględnił tego wyniku we wnioskach. Za najważniejsze uznał wykazanie skuteczności probiotyku wielogatunkowego w zmniejszeniu całkowitego ryzyka biegunki, niezależnie od jej etiologii w trakcie antybiotykoterapii.

Z punktu widzenia pacjenta interwencja zmniejszająca ryzyko wystąpienia jakiegokolwiek biegunki w trakcie antybiotykoterapii ma znaczenie. Jednak z punktu widzenia poprawności metodologicznej nie zgadzam się z takim porządkiem wniosków, podkreślam rozbieżność pomiędzy celem i wnioskiem z badania. Cel pracy dotyczy biegunki związanej z antybiotykoterapią z wykluczaniem czynników infekcyjnych, wniosek odnosi się do biegunki w trakcie antybiotykoterapii bez określania jej przyczyny.

Występowanie biegunki bez względu na etiologię było drugorzędowym punktem końcowym. Biegunka związana była z infekcją rotawirusową i młodszym wiekiem badanych. Autor w opublikowanej pracy (druga pozycja z prac wchodzących w skład rozprawy) podkreśla, że taki wynik może wskazywać raczej na ochronną rolę probiotyków w biegunce rotawirusowej, co jednak nie było przedmiotem badania.

Z dużą ostrożnością trzeba interpretować stwierdzoną wyższą częstość występowania biegunki i potrzeby dożylnego nawodnienia w grupie otrzymującej placebo (obserwowane wyłącznie w polskiej grupie). Należy zauważyć, że w polskiej grupie prawie wszyscy badani pacjenci byli hospitalizowani, co sprzyja występowaniu infekcji szpitalnych, szczególnie rotawirusowych. Na wystąpienie tych infekcji miało wpływ wiele innych czynników, np. szczepienie przeciw rotawirusom, pora roku. Biorąc pod uwagę antybiotykoterapię prowadzoną w warunkach szpitalnych, wysoki odsetek leczenia antybiotykami drogą dożylną, niechęć do nawadniania doustnego i preferowanie nawadniania dożylnego u dzieci hospitalizowanych w polskich szpitalach ocena rzeczywistych wskazań do nawodnienia dożylnego w przebiegu biegunki nie jest obiektywna.

Poczynione z obowiązku recenzenta uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej mi do recenzji pracy, stanowią natomiast podstawę do dyskusji podczas publicznej obrony.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską lekarza Jana Łukasika oceniam bardzo wysoko. Jest ona świadectwem dojrzałości naukowej Doktoranta, wyrazem Jego pasji i ogromnej dbałości o najwyższe standardy pracy badawczej. Rozprawa doktorska stanowi cenne źródło informacji, ma duże znaczenie kliniczne, wskazuje kierunki dalszego rozwoju Doktoranta.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) w związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza Jana Łukasika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o wyróżnienie niniejszej pracy.



Dr hab. n. med. Elżbieta Jarocka-Cyrta

