

Prof. dr hab. Ewa Stachowska
Zakład Żywienia Człowieka i Metabolomiki
Pomorski Uniwersytet Medyczny
w Szczecinie

Szczecin 23 08. 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr.inż Małgorzaty Frajberg

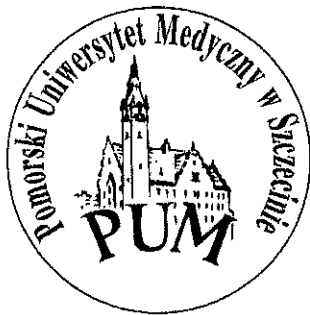
”Żywienie dzieci a mikroflora przewodu pokarmowego w obrazie parametrów diagnostycznych”

Żywienie odgrywa kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu „prawidłowej” mikrobioty jelitowej dziecka. Pojęcie „prawidłowej” mikrobioty zostało po raz pierwszy zdefiniowane przez Joshuę Lederberga jako środowisko mikroorganizmów komensalnych, symbiotycznych i patogennych, które współdzielią tę samą przestrzeń w naszym organizmie. Określa się ją mianem eubiozy.

Obecnie, „prawidłową” mikrobiotę definiuje się jako niezwykle zróżnicowane środowisko różnych gatunków bakterii, archeonów, wirusów, grzybów, a nawet pasożytów, które występują w przewodzie pokarmowym w odpowiednich proporcjach. Te proporcje, kształtując funkcjonowanie bariery jelitowej i modulując funkcje innych organów, są kluczowe dla zdrowia zarówno dzieci, jak i osób dorosłych.

W pierwszych latach życia, gdy mikrobiota jest w fazie kształtowania, skład i jakość pożywienia mają bezpośredni wpływ na różnorodność bakteryjną. Może to wpłynąć na zdrowie i odporność w dłuższej perspektywie. Podkreśla się zjawisko pierwszych 1000 dni życia jako kluczowe dla kształtowania mikrobiomu, ponieważ to w tym czasie kontakt dziecka z bakteriami w trakcie ciąży i podczas porodu znacząco wpływa na odpowiedź immunologiczną noworodka. Czynniki takie jak narażenie na procedury medyczne, termin porodu, choroby autoimmunologiczne matki, antybiotykoterapia w czasie ciąży oraz dieta matki również mają znaczenie.

Kolejnym ważnym elementem wpływającym na mikrobiotę jelitową dziecka jest karmienie piersią. Mikrobiom mleka matki to unikalny zestaw bakterii, którego skład dramatycznie zmienia się w zależności od okresu laktacji. Żadna formuła mleka nie jest w stanie zapewnić takiego składu bakteryjnego.



Sam mikrobiom tydzień po porodzie jest mało zróżnicowany; w przypadku dzieci urodzonych naturalnie dominują Actinobacteria, w przeciwieństwie do dzieci urodzonych przez cesarskie cięcie, gdzie dominują Firmicutes. Różnorodność wzrasta z wiekiem, co jest wynikiem wprowadzenia do diety stałego pokarmu.

Ostatecznie, to co dziecko je, wpływa na dalsze kształtowanie mikrobiomu. O ile historia porodu i karmienia w pierwszych 1000 dni życia ma znaczące znaczenie, to również czynniki takie jak dysbioza mogą wpływać na objawy czynnościowych bólów brzucha u dzieci. Badania sugerują, że u niektórych dzieci z tymi dolegliwościami może występować specyficzna przebudowa mikrobioty jelitowej.

Oryginalność problemu badawczego

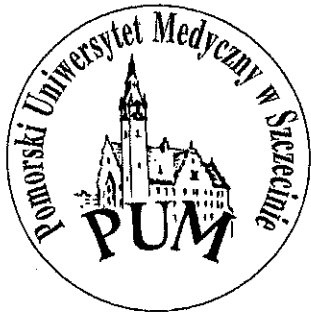
Czynnościowe bóle brzucha u dzieci stanowią problem, który wymaga opracowania łatwych i nieinwazyjnych narzędzi diagnostycznych. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę miały na celu ustalenie, czy analiza tak złożonego ekosystemu jak mikrobiota jelitowa oraz jej metabolity mogą być badane poprzez prostą metodę analizy moczu i kału.

Wydaje się, że jest to obiecujący kierunek w poszukiwaniu narzędzi diagnostycznych, gdyż obecnie dopiero zaczynamy stosować tego typu metody - bezpośredniego badania metabolitów (stosowaną w praktyce laboratoryjnej) w diaganostyce.

Metody, jakimi posługiwaliśmy się do tej pory w badaniach, takie jak analiza całego metabolomu za pomocą chromatografii i spektrometrii, są wykorzystywane głównie w celach badawczych, a nie klinicznych. Dlatego odnalezienie specyficznej cząsteczki/cząstek, która mogłaby służyć jako wskaźnikowy metabolit i wskazywać źródło problemów w diagnozowaniu przyczyn czynnościowych bólów brzucha, wydaje się być istotnym krokiem naprzód. Ale nadal – choć te metody są na rynku od paru lat, są mało znane – nawet w gronie lekarzy czy dietetyków.

Doktorantka do swojego badania zakwalifikowała dzieci, które z powodu dolegliwości jelitowych były objęte interwencją dietetyczną - stosowały dietę o obniżonej zawartości fermentujących węglowodanów lub dietę zgodną z zaleceniami NICE. W wyniku badań, doktorantka zidentyfikowała metabolit, który może pełnić funkcję wskaźnikową. Chodzi o dearabinitol, którego poziom wzrastał u ponad 90% badanych dzieci z zaburzeniami czynnościowymi jelita.

Znaczenie problemu badawczego



Pomimo wieloletnich badań nad przyczyną czynnościowych bóli brzucha u dzieci nadal wiele obszarów do zbadania np. w obszarze wpływu na ten proces mikrobioty jelitowej.

Celem pracy była ocena mikrobioty przewodu pokarmowego dzieci ze zdiagnozowanym czynnościowym bólem brzucha w relacji do zastosowanej interwencji dietetycznej - ale nie w badaniu bezpośrednim mikrobioty jelitowej- tylko w obrazie parametrów diagnostycznych.

Doktorantka sformułowała cztery hipotezy badawcze:

Po pierwsze, że dzieci z czynnościowym bólem brzucha mają nieprawidłową mikrobiotę jelitową

Po drugie, że modulacja dietetyczna może wpłynąć na skład mikrobioty jelitowej

Po trzecie, że odpowiednio dobrana terapia dietetyczna może korzystnie wpłynąć na zmiany mikrobioty przewodu pokarmowego

Po czwarte że diagnostyka mikrobioty przewodu pokarmowego może być przydatnym narzędziem w profilaktyce dzieci z czynnościowym bólem brzucha. A sama diagnostyka w oparciu o to narzędzie może być pomocna w praktyce klinicznej.

W celu zbadania prawdziwości swoich hipotez badawczych Doktorantka sformułowała trzy cele badania:

1. Ocenę zależności pomiędzy analizowanymi parametrami po zastosowaniu interwencji dietetycznej w zależności od początkowego składu mikrobioty u dzieci z czynnościowym bólem brzucha
2. Ocenę oceny zależności pomiędzy dietą lowFODMAP a zmianą składu mikrobioty jelitowej w ocenie parametrów diagnostycznych
3. Ocenę możliwości wykorzystania analizowanych testów diagnostycznych w praktyce

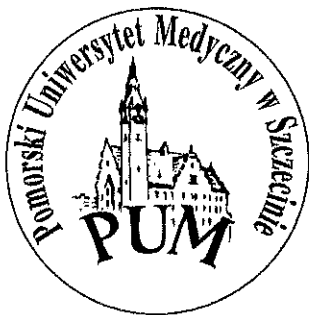
Oryginalność i trafność metod oraz narzędzi badawczych

Układ pracy

Praca ma układ typowy, pierwsza część to **wstęp** napisany bardzo wyczerpująco, bardzo starannie i w oparciu o aktualną literaturę.

Brakuje mi tylko opisu mykobioty, która została potraktowana przez Doktorantkę zbyt ogólnikowo -- szczególnie w kontekście opisu reszty mikroorganizmów jelitowych.

Doktorantka wyczerpująco za to opisała metabolity mikrobioty wykorzystane w stosowanym w dalszych badaniach teście diagnostycznym. Opisała także rolę zonuliny, z uwzględnieniem badań przeprowadzonych także na osobach dorosłych (nie tylko na dzieciach.)



Na podkreślenie zasługuje bardzo płynna forma omawianych treści – zaplanowanych tak by sukcesywnie wprowadzać czytelnika w tematykę badania.

Mam parę uwag do rozdziału :

1. W stopce pojawia się tajemniczy ciąg cyfr
2. Na str 16 brakuje cytowań literatury.
3. Na str. 23 od zdania ...Zródła Providencja – tekst jest rozformatowany
4. Str 24/23. Nie jest zrozumiałe dla mnie i proszę Doktorantkę o wytłumaczenie zdania ... W badaniu z 2021 ... W rezultacie zmienia się sprawność gospodarza ja i samego drobnoustroju.” O jaką sprawność chodzi?
5. Str.28/29/37 – brak cytowań
6. Str.36 – stanowczo za mało miejsca Doktorantka poświęciła mykobiocie przewodu pokarmowego
7. Str 47 - dietę powinno się z racji ograniczeń nazywać low FODMAP

Część cele i hipotezy pracy – sformułowane prawidłowo

Część doświadczalna- Opisana dość starannie, choć zabrakło narzędzia statystycznego którym posłużono się do oszacowania wielkości grup – badanej i kontrolnej. Zwykle do analizy używa się programu G Power 3.1 – jakich narzędzi użyła Doktorantka?

Brakuje części związanej z pomiarami antropometrycznymi pacjentów i badaniami stanu czynnościowego jelita.

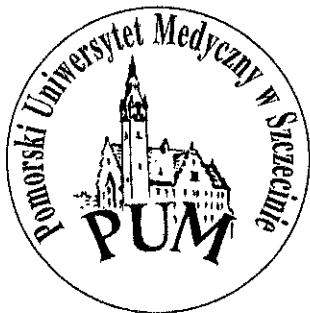
Dlaczego do włączenia do badań zostały zastosowane Kryteria Rzymskie III, skoro są już IV?

Czy zbierane były dane dotyczące doczasowej diety dzieci?

Doktorantka powinna opisać bardziej wyczerpująco metody zastosowane w pracy: hodowlę bakterii jak i metodę chromatografii ze spektrometrią mas. Pomimo, że były zlecone na zewnątrz ten opis jest ważnym uzupełnieniem pracy. I musi być dodany do przyszłych publikacji.

Reasumując, uważam, że Doktorantka zrealizowała w większości cele ponieważ:

1. Przeanalizowała liczebność bakterii/zonuliny w stolcu dzieci przed i po zastosowaniu obydwu typów diet co jest wypełnieniem celu nr 1 Doktorantki



2. Przeanalizowała zmiany metabolitów mikrobioty w moczu dzieci przed i po zastosowaniu obydwu typów diet – co jest wypełnieniem celu nr. 2 Doktorantki
3. Zbyt mała grupa badanych w mojej opinii uniemożliwia wiarygodną odpowiedź na cel nr. 3 czyli ocenę możliwości wykorzystania analizowanych testów jako wskaźników choroby u dzieci. Dodatkowa zgoda Komisji Bioetycznej i możliwość przeanalizowania pod tym kontem danych zgromadzonych w bazie Alab sp z o.o. byłaby w tym celu wyskoczę wskazana.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane przez Doktorantkę z dobrą znajomością tematu. Rozdział **Dyskusja** nawiązuje do uzyskanych wyników. Doktorantka krytycznie i w oparciu o literaturę umiejętnie przedyskutowała uzyskane wyniki.

Pytania do tej części:

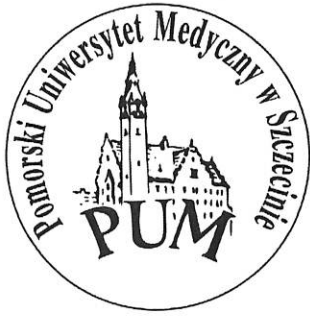
Czy Doktorantka zakłada że wcześniejsze leczenie dzieci np. antybiotykoterapia mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki?

Czy dotychczasowa dieta – może być czynnikiem wpływającym na końcowy wynik?

Czy Doktoranta wie czy pacjenci stosowali suplementację np. probiotykami, która może mieć kardynalne znaczenie dla zmiany metabolomu w moczu czy szczelnością bariery jelitowej mierzonej stężeniem zonuliny w kale?

Umiejętność krytycznej analizy danych – bardzo dobra

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania z art. 13 ustawy 1 z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U z 2017 r. poz.1789). Praca jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Doktorantka wykazała się dobrą wiedzą dotyczącą wpływu mikrobioty jelitowej na metaboliczne parametry moczu i kału u dzieci z czynnościowymi bólami brzucha, a także umiejętnościami do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z art. 179 ust 1. i ust. 3 pkt 1 oraz 2 lit. b Ustawy "Przepisy



wprowadzając ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Fraiberg do dalszych etapów postępowania.

Z wyrazami szacunku

KIEROWNIK
Katedry Żywności Człowieka i Metabolizmu
prof. dr hab. h.c.med. Ewa Stachowicz