

**II KLINIKA NEONATOLOGII**  
GINEKOLOGICZNO-POŁOŻNICZY SZPITAL  
KLINICZNY im. H. Święcickiego UMP  
60-535 POZNAŃ UL. POLNA 33  
☎(48) 61-8419409, FAX (48) 61-8419650  
e-mail: 2kn@ump.edu.pl



**II DEPARTMENT OF NEONATOLOGY**  
POZNAŃ UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES  
60-535 POZNAŃ, UL. POLNA 33, POLAND  
☎ (48)61-8419409, FAX: (48)61-8419650  
e-mail: 2kn@ump.edu.pl

Poznań, 10.05.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Alicji Harmozy pt. „Variability of the microbiome of pregnant women and its impact on the frequency of preterm birth”**

**Promotor pracy: dr hab. n. med. Iwona Sadowska-Krawczenko, Prof. UMK**

Mikrobiom noworodka zależy zarówno od czynników środowiskowych, jak i genetycznych i wpływa na stan zdrowia dziecka. Dysbioza, a więc zaburzenia jakościowej i ilościowej równowagi mikrobiologicznej organizmu, postrzegana jest jako czynnik patogenetyczny wielu chorób okresu noworodkowego. Transfer mikrobiomu rozpoczyna się już w okresie prenatalnym i determinowany jest przez mikroflorę macicy, pochwy, przewodu pokarmowego i jamy ustnej matki. Dane literaturowe sugerują, że mikrobiom noworodków urodzonych drogami natury różni się od mikrobiomu noworodków urodzonych drogą cięcia cesarskiego. Innym krytycznym czynnikiem odpowiedzialnym za dysbiozę w okresie noworodkowym jest wiek ciążowy w chwili urodzenia. Odmienność mikrobiomu u noworodków urodzonych przedwcześnie wynika z nagłego przerwania rozwoju płodu w trzecim trymestrze ciąży, wyższego odsetka porodów drogą cięcia cesarskiego, pobytem na oddziale intensywnej terapii oraz stosowaniem szerokiej farmakoterapii. Opisywanych jest wiele negatywnych konsekwencji dysbiozy, takich jak dezaktywacja i nieprawidłowy rozwój układu odpornościowego, zaburzenia rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, problemy z trawieniem i przemianą materii.

Mikrobiota pochwy zapewnia homeostazę oraz stanowi barierę zapobiegającą kolonizacji przez drobnoustroje chorobotwórcze. Zachwianie równowagi mikrobiologicznej w ekosystemie pochwy może powodować rozwój waginozy bakteryjnej lub zapalenia pochwy. Zarówno waginoza bakteryjna jak i stany zapalne pochwy i sromu mogą przyczyniać się do wystąpienia powikłań ciąży, w tym do porodu przedwczesnego. Bakteriami najczęściej związanymi z porodem przedwczesnym są *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Mycoplasma hominis* oraz *Ureaplasma urealyticum*. Mikrobiom matki jest niezwykle ważny także po urodzeniu się dziecka – skóra noworodka podczas porodu drogami natury jest kolonizowana przez bakterie pochodzące z pochwy, a mleko matki zawiera bakterie z rodzaju

*Lactobacillus*, które z kolei kolonizują przewód pokarmowy dziecka.

Przedstawiona do recenzji praca Pani Alicji Harmozy, porusza niezwykle istotny problem różnorodności mikrobiomu u kobiet ciężarnych i jego wpływu na częstość występowania porodów przedwczesnych.

Manuskrypt wraz z wszystkimi załącznikami liczy 96 stron. Przygotowany został w języku angielskim, jako że doktorantka była słuchaczką interdyscyplinarnych, anglojęzycznych, stacjonarnych studiów doktoranckich o zasięgu międzynarodowym, na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Manuskrypt podzielony został na typowe rozdziały, zawiera 22 tabele i 29 wykresów (Graphs), co ułatwia przeanalizowanie danych i zrozumienie tekstu. Piśmiennictwo liczy 126 pozycji, z czego ponad połowa to prace z ostatnich 10 lat. Doktorantka uzyskała zgodę właściwej Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badania.

Pierwszy rozdział pracy, czyli „Introduction”, doktorantka podzieliła na kilka podrozdziałów, w których omówiła problematykę wcześniactwa – definicja porodu przedwczesnego, metody szacowania terminu porodu, epidemiologia, czynniki ryzyka i najczęstsze powikłania wcześniactwa). W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Microbiome and microbiota” przedstawiła zagadnienia dotyczące mikrobiomu i dysbiozy, ze szczególnym uwzględnieniem zmian jakie zachodzą u kobiet ciężarnych. Rozdział 3 zatytułowany „Maternal Blood Parameters and the Impact on Preterm Delivery” omawia zmiany w zakresie parametrów laboratoryjnych u kobiet ciężarnych, które mogą wpływać na wystąpienie porodu przedwczesnego. Myślę, że rozdziały 1-3 powinny łącznie stanowić wstęp do pracy („Introduction”), podzielony na kilka części.

Niepotrzebna w tekście jest Tabela 1, w której doktorantka przedstawia regułę Naegelego oraz określanie terminu porodu na podstawie daty ostatniej miesiączki jako dwa alternatywne sposoby oszacowania wieku ciążowego, podczas gdy *de facto* jest to ta sama metoda. Dodatkowo błędny jest tytuł tabeli, który powinien raczej brzmieć – „Most accurate gestational age assessment method”. Trudno też zgodzić się, że są to najdokładniejsze metody oceny wieku ciążowego; dużo bardziej precyzyjną metodą jest przecież badanie USG. Do Tabeli 2 wkradł się błąd przy podziale noworodków urodzonych przedwcześnie – w żadnej kategorii nie został uwzględniony 33.t.c.. Tabela 4 dość ogólnikowo traktuje powikłania wynikające z wcześniactwa i tu również wkradło się kilka błędów i nieścisłości – leczenie chirurgiczne nie jest przecież podstawowym sposobem leczenia NEC; nie wspomniano o leczeniu ROP za pomocą iniekcji przeciwciał monoklonalnych; nie uwzględniono braku autoregulacji przepływu mózgowego jako przyczyny krwawień dokomorowych. Dane z wykresów 1 i 2 powinny zostać przedstawione na jednej rycinie – byłyby wówczas zdecydowanie bardziej obrazowe. Pojawiło się też kilka nieścisłości pomiędzy danymi w tekście i w Tabeli 5. Autorka podaje, że odsetek wcześniactwa w Polsce wynosi 6,1%, podczas gdy w Tabeli ta wartość odnosi się tylko do noworodków urodzonych między 32. a 36. t.c., a łączny odsetek wcześniactwa (zgodnie z Tabelą 5) to 7,2% (25,581 wcześniaków na 356,540 wszystkich noworodków). Ponadto tytuł Tabeli 5 powinien brzmieć „The Number of *Premature Births* in Poland in 2020”.



Celem pracy była ocena różnorodności mikrobiomu jelitowego kobiet ciężarnych i jego potencjalnego wpływu na występowanie porodów przedwczesnych. Hipotezę i cel główny badania autorka określiła w Rozdziałach 4 i 5, które znowu mogły być potraktowane jako jedna część rozprawy. Dodatkowym elementem pracy, była próba stworzenia algorytmu uczenia maszynowego, celem predykcji ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego. Autorka nie uwzględniła jednak tego aspektu w założeniach i celach pracy, i pojawia się on dopiero w części metodologicznej oraz w wynikach.

Szósty rozdział rozprawy zatytułowany został „Methodology of microbiome research”. Autorka przedstawia tu projekt badania, grupy badawcze, sposób pobierania materiału i dalej szczegółowo metody analizy mikrobiomu oraz sposób tworzenia algorytmu uczenia maszynowego. Brakuje w tym rozdziale określenia w jakim czasie i gdzie prowadzone było badanie oraz ile pacjentek zostało włączonych do badania (ta informacja pojawia się dopiero w wynikach). W Tabeli 7 pojawił się błąd w kolumnie „Exclusion criteria”, gdzie jako jedno z kryteriów podano „ $\leq 16$  weeks”. Niejasne są tutaj również sformułowania – “Absence of **certain** medical conditions or treatments” oraz “No use of **certain** medications or treatments during pregnancy” – brakuje informacji jakie konkretnie stany, metody leczenia czy leki stanowiły kryterium wyłączenia z badania. Bardzo ciekawy i niezwykle precyzyjny jest natomiast opis metodologii analizy mikrobiomu.

Autorka przeprowadziła badanie, w którym od pacjentek pobierano wymazy z części pochwowej i zewnętrznego ujścia szyjki macicy oraz wymaz z odbytu. Z uzyskanych próbek izolowano DNA, wykonywano identyfikację drobnoustrojów wykorzystując technikę PCR z zastosowaniem odpowiednich starterów, a następnie przeprowadzano analizę bioinformatyczną mikrobiomu. Dodatkowo analizowano wyniki badań laboratoryjnych pacjentek oraz dane z wywiadu medycznego. Do badania włączono 28 pacjentek, u których ciąża zakończyła się porodem przedwczesnym (między 24. a 36+6/7 t.c) oraz grupę kontrolną 22 pacjentek, które urodziły  $\geq 37$ .t.c.

Na podstawie przeprowadzonej analizy doktorantka wykazała istotną różnicę w zakresie różnorodności mikrobiomu pomiędzy grupą kobiet, które urodziły przedwcześnie i tych, które urodziły o czasie. W przypadku pacjentek, które urodziły przedwcześnie zróżnicowanie mikrobiomu było zdecydowanie mniejsze. Wykazała również, że stworzony algorytm uczenia maszynowego obejmujący wyniki badań laboratoryjnych, dane z wywiadu oraz podstawowe dane antropometryczne może być przydatny w ocenie ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego.

W rozdziale „Results” zauważyłam jednak również kilka nieścisłości i błędów. W Tabeli 10 autorka podaje masę ciała matek i tu z danych dotyczących grupy badanej wynika, że minimalna masa ciała wynosiła 146 kg (!), a maksymalna 115 kg, co na pewno mija się z prawdą. W wierszu dotyczącym tygodnia porodu dane podane są natomiast odwrotnie – min. 35 / max. 32 oraz min. 42 / max. 41. Błędnie podane są też wartości mediany i odchylenia standardowego. Ponadto przy poszczególnych parametrach nie wskazano w jakich

jednostkach są podawane wartości.

W kolejnych kilku wykresach i tabelach (Graphs 4, 8, 10, 12, 16, 18, 21) autorka zamiennie stosuje pojęcia „median” – w tytułach wykresów oraz „mean” w nagłówkach tabel. Nie wiadomo wobec tego jak ostatecznie interpretować te dane i czy są tu podane średnie czy mediany. Co więcej wartości podane sumarycznie w Tabeli 11 są inne niż na poszczególnych wykresach i w kolejnych tabelach, pomimo iż wartości  $p$  są dokładnie takie same, za wyjątkiem Tabeli 14, gdzie wartość  $p$  została błędnie przepisana. Przypuszczam, że w Tabeli 11 podano wartości median, a w kolejnych tabelach i wykresach wartości średnich, należałoby się jednak zastanowić czy było to konieczne i czy wielokrotne przytaczanie tych samych *de facto* danych cokolwiek nowego wnosi do pracy.

W Tabeli 11 moją wątpliwość budzi porównanie wartości WBC w grupie badanej i kontrolnej, gdzie mediana wynosi odpowiednio 11,76 oraz 11,2, natomiast obliczono że różnica jest istotna statystycznie i  $p$  wynosi  $1 \times 10^{-19}$ . Patrząc tylko pobieżnie na te wartości wydaje się to mało prawdopodobne i myślę, że wymaga to sprawdzenia.

Warto zwrócić uwagę, że na wykresach 7 i 9 wyniki zaprezentowane są odmiennie niż na analogicznych wykresach 11, 13, 14, 17, 19 (na osi X tydzień ciąży, na osi Y parametr mierzony i odwrotnie na kolejnych wykresach), co znacznie utrudnia czytanie i interpretację wyników. Na części wykresów brakuje również wyjaśnienia w jakich jednostkach są prezentowane dane (np. Graph 26).

Niezbyt spójna w całej pracy jest również numeracja tabel i wykresów – są np. dwa różne wykresy o numerach 12 i 13, zdanie w tekście odnoszące się do Graph 23 dotyczy Graph 24 (str. 63), zdanie odnoszące się do Graph 26 dotyczy Graph 28 (str. 69), a zdanie odnoszące się do Graph 28 dotyczy Graph 29 (str. 71). W tekście brakuje też odniesień do części tabel i wykresów.

Zbyt lakonicznie potraktowany został opis wyników uczenia maszynowego. W ostatecznym modelu pojawiają się parametry, o których w pracy nie było wcześniej wzmianki – np. ciężar właściwy moczu, PROM/PPROM, AFI. Nie do końca jasna jest również interpretacja modelu, w której autorka podaje, że *„hematocrit was the most critical feature... for predicting preterm birth”*, co oznaczałoby, że wartość hematokrytu u matki jest czynnikiem najbardziej predykcyjnym dla wystąpienia porodu przedwczesnego. Czy rzeczywiście można wyciągnąć taki wniosek i czy jest on uzasadniony klinicznie? Uważam, że w modelu tym warto by również wziąć pod uwagę różnorodność mikrobiomu czy występowanie w wymazach określonych drobnoustrojów, co zostało zupełnie pominięte. Celem pracy była przecież ocena wpływu mikrobiomu kobiety ciężarnej na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. W modelu uczenia maszynowego ten aspekt nie został uwzględniony, a myślę, że jego włączenie zdecydowanie zwiększyłoby wartość pracy.

Swoje wyniki Pani Alicja Harmoza skonfrontowała z wynikami innych autorów w dyskusji. Omówiła wcześniejsze badania wskazujące na rolę mikrobiomu matczynego w porodach przedwczesnych, zauważając że w szeregu badań wskazywano na obecność tych samych bakterii w grupie kobiet, u których doszło do



porodu przedwczesnego. W związku z tym takie bakterie jak *Prevotella*, *Finexgoldia*, *Faecalibacterium* oraz *Peptoniphilus* mogą być ważnymi biomarkerami, pozwalającymi na ocenę ryzyka porodu przedwczesnego.

W dyskusji doktorantka zwróciła również uwagę na niezwykle istotny element badania jakim było precyzyjne pobieranie wymazów do analizy mikrobiomu, tak aby nie doszło do zanieczyszczenia drobnoustrojami z innych środowisk. Podkreśliła różne metody pobierania materiału w innych badaniach, co mogło wpłynąć na ostateczne ich wyniki.

Dyskusja została przeprowadzona w sposób poprawny. Doktorantka wykazała się znajomością tematu, umiejętnością krytycznego omówienia wyników badań własnych i porównania ich z wynikami innych autorów.

Publikacje są odpowiednio cytowane w tekście, jednak w bibliografii brakuje prawidłowych danych dla pozycji 21, 24, 33, 34, 60, 67, 98. Bibliografia jest też bardzo chaotyczna pod względem formatu – dane poszczególnych publikacji są podawane w bardzo różny, niespójny sposób. Wymaga to na pewno poprawienia.

Z obowiązku recenzenta muszę jeszcze zwrócić uwagę na fakt, że do pracy wkradło się kilka błędów językowych, głównie w zakresie niewłaściwego zastosowania pewnych słów angielskich oraz gramatyki. Ponadto, jako że praca napisana została w języku angielskim, w ułamkowych wartościach liczbowych stosować należy konsekwentnie kropkę a nie przecinek (np. w Tabeli 10). Pisanie pracy w języku angielskim jest niewątpliwie trudne, wobec czego przed publikacją uzyskanych danych w czasopismach anglojęzycznych warto skorzystać z pomocy lingwisty.

Rozprawa doktorska Pani Alicji Harmozy jest ciekawym opracowaniem naukowym, dostarczającym nowych danych dla wiedzy klinicznej, co uzasadnia kontynuację badań nad mikrobiomem i jego transferem maczyno-płodowym i maczyno-noworodkowym. Ciekawym elementem pracy jest niewątpliwie zastosowanie algorytmu uczenia maszynowego do predykcji wystąpienia porodu przedwczesnego. Metody takie nie są powszechnie stosowane, istnieje w tym zakresie kilka badań, które jednak stosowały odmienne predyktory.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawione uwagi krytyczne i wychwycone nieścisłości nie mają wpływu na ocenę przedstawionej mi do recenzji pracy. Doktorantka w sposób właściwy przeprowadziła badanie naukowe realizując cel pracy i potwierdzając postawioną na początku rozprawy hipotezę badawczą.

Rozprawa doktorska lek. Alicji Harmozy pt. „Variability of the microbiome of pregnant women and its impact on the frequency of preterm birth” odpowiada pod względem merytorycznym i formalnym wymogom stawianym na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne oraz spełnia warunki określone w art. 13 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 późniejszymi zmianami).

Mam zatem zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie lek. Alicji Harmozy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Katarzyna Wróblewska-Seniul  
specjalista pediatr  
specjalista neonatolog  
9568024