

O c e n a

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Alicji Harmozy.

p. t.

„Variability of the microbiome of pregnant women and its impact on the frequency of preterm birth”.

Do niedawna nie docenialiśmy zasadniczej wspólnej roli dwóch najbardziej złożonych układów w organizmie, które decydują o naszym stanie zdrowia, czyli układu pokarmowego oraz układu nerwowego – jelit i mózgu. Połączenie między umysłem a ciałem to biologiczny fakt oraz ważne ogniwo prowadzące do zrozumienia, czym jest zdrowie całego organizmu. Współczesne badania wskazują, że jelita, pozostające w ścisłej interakcji z zamieszkującymi je drobnoustrojami, mogą oddziaływać na nasze emocje, wrażliwość na ból oraz interakcje społeczne, a nawet kierować wieloma z naszych decyzji. Tak zwana „intuicja trzewna” czyli złożona komunikacja pomiędzy jelitami a mózgiem odgrywa rolę w sytuacjach, gdy podejmujemy jedno z najważniejszych decyzji w życiu.

Zainteresowanie tym zagadnieniem można w dużym stopniu przypisać znacznemu przyrostowi wiedzy na temat bakterii, pierwotniaków, grzybów czy wirusów bytujących w naszych jelitach, które zbiorczo określa się mianem mikrobioty. Oddziałuje ona na znajdujące się w jelitach liczne komórki wydzielnicze, które łącznie tworzą skupisko większe od pozostałych gruczołów wydzielania wewnętrznego, gonad, tarczycy, przysadki, nadnerczy razem wziętych. Co więcej, podobne relacje mikrobioty dotyczą także zgromadzonych w jelitach komórek odpornościowych, których w ścianach jelit jest więcej niż krąży ich we krwi i pozostaje w szpiku kostnym. Zlokalizowany w ścianach jelit system obrony immunologicznej potrafi zidentyfikować i zniszczyć, wśród trylionów pożytecznych drobnoustrojów, relatywnie niewielką ilość niebezpiecznych bakterii, które mogą przypadkiem trafić do naszych jelit.

Korzyści czerpane z obecności w jelitach mikrobioty decydują o naszym zdrowiu. Z kolei zaburzenia czy modyfikacje mikrobiomu jelitowego kojarzą się z długą listą chorób, dotyczących nie tylko przewodu pokarmowego, ale także między innymi funkcji

ośrodkowego układu nerwowego, przy czym należy podkreślić, że lista ta wypełnia się coraz to nowymi patologiami, do których powstania zaburzenia mikrobioty przyczyniają się w sposób bezpośredni. Jedną z takich patologii jest występowanie porodu przedwczesnego, będącego częstą przyczyną zaburzeń zdrowotnych występujących nie tylko we wczesnym okresie życia, ale także mającym wpływ na całą naszą dorosłą aktywność.

Tym tematem zainteresowała się lek. med. Alicja Harmoza, wpisując się w aktualny trend badawczy, obejmujący analizę mikrobioty i jej wpływ na zdrowie człowieka.

Przedstawiona do recenzji praca p. t. „Variability of the microbiome of pregnant women and its impact on the frequency of preterm birth” jest 92 stronicowym opracowaniem, spełniającym od strony redakcyjnej wszelkie wymogi obowiązujące dla tego rodzaju monografii.

Doktorantka przeprowadziła analizę mikrobioty w dwóch grupach kobiet ciężarnych, których ciążę zakończyły się bądź porodem o czasie bądź też przedwczesnym urodzeniem dziecka. Postawiła hipotezę badawczą dotyczącą istotnej różnicy mikrobiomu w tych dwóch sytuacjach zakończenia ciąży jako przyczynę porodu przedwczesnego. Do analizy danych wykorzystwała nowoczesne narzędzie, imitujące pracę mózgu, wchodzące w zakres sztucznej inteligencji, tzw. „machine learning”, pozwalające zestawiać dane z wielu źródeł o różnych formatach i tworzące, z niespotykaną do tej pory szybkością, algorytmy pozwalające przewidywać występowanie pewnych zjawisk na podstawie znacznej ilości danych.

Rozprawa składa się z 9 głównych rozdziałów. We wstępie (introduction), doktorantka definiuje poród przedwczesny i wszelkie związane z tym faktem komplikacje dla noworodka. Kolejny rozdział poświęcony jest opisowi mikrobiomu u ciężarnej, a następnie, wymienione są niektóre parametry krwi matki, które zdaniem doktorantki mogą mieć wpływ na wystąpienie porodu przedwczesnego. W kolejnych dwóch rozdziałach przedstawione zostały założenia i cel pracy. W dalszej części dysertacji opisana została, metodologia badania mikrobiomu, wyniki badań oraz podsumowanie i wnioski. W trzech kolejnych rozdziałach autorka zawarła streszczenie, spis piśmiennictwa oraz załączniki w tym również zgodę Komisji Bioetycznej na realizację badania. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane, obejmuje 126 pozycji, z których znaczny odsetek stanowią publikacje z

ostatnich kilku lat. Praca ilustrowana jest 22 tabelami i 29 rycinami, przejrzystymi, jasno opisanymi, ułatwiającymi ocenę poszczególnych części pracy.

Wstęp, stanowi gruntowny przegląd wiedzy na tematy związane z definicją porodu przedwczesnego oraz zagrożeniami wynikającymi z tego faktu dla stanu klinicznego noworodka. Doktorantka przytacza światowe dane epidemiologiczne, dotyczące częstości występowania porodów przedwczesnych, prezentując kraje o najniższych i najwyższych współczynnikach wcześniactwa. Recenzujący sugeruje wprowadzenie drobnego uzupełnienia w tabeli nr 2, dotyczącego zakresu dojrzałości noworodków LPT. W podrozdziale omawiającym czynniki ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego, lek. Alicja Harmoza szczególną uwagę zwraca na występowanie dysbiozy pochwy i udział niektórych bakterii w stymulacji reakcji zapalnej, w następstwie której dochodzi do wyzwolenia przedwczesnej akcji porodowej.

W rozdziale omawiającym mikrobiom i mikrobiotę doktorantka opisuje poszczególne definicje dotyczące mikrobiomu i jego składników a także wyjaśnia pojęcie taksonomii i przytacza metody którymi ta gałąź nauki się posługuje w opracowywaniu nazewnictwa i wzajemnych relacji zachodzących w całej mikrobiocie. Zwraca też uwagę na zmiany w mikrobiomie zachodzące pod wpływem ciąży i ponownie podkreśla znaczenie dysbiozy w narastaniu ryzyka porodu przedwczesnego. Opisuje między innymi zmiany mikrobioty zachodzące pod wpływem ciąży w jamie ustnej czy w jelitach. Interesującym jest fragment rozdziału dotyczący rozważań na temat mikrobiomu pochwy ze szczególnym uwzględnieniem roli mikrobiomu szyjki macicy, która jest barierą pomiędzy sterylnym środowiskiem wewnątrzmacicznym a pełnymi różnej flory bakteryjnej drogami rodzymi. To właśnie nieszczelność szyjki macicy jest przyczyną wnikania bakterii do jamy macicy i następowego rozwoju zapalenia wód płodowych z wydzielaniem cytokin prozapalnych i uruchamianiem przedwczesnej akcji porodowej. Oprócz wymienionych przez doktorantkę MCP-1 oraz IL-6 recenzent pragnie zwrócić uwagę także na rolę IL-1 β w uruchamianiu akcji porodowej i to zarówno w porodzie przedwczesnym jak i w przypadku ciąży donoszonej. Ciekawym w opinii recenzenta jest fragment rozdziału opisujący rolę łożyska i występującego w nim mikrobiomu, mającego wpływ na strukturę błon płodowych a także obecność mikrobiomu w endometrium. Mikrobiom zdaje się wywierać istotny wpływ na implantację zarodka. Co więcej, występowanie wspólnych drobnoustro-

jów w łożysku, smółce płodu czy nawet w mózgu dziecka, co sugerują badania Romero i wsp., przedstawia łożysko jako narząd odpowiedzialny za kolonizację bakteriami jamy macicy i płodu. A zatem, środowisko, które do niedawna uważane było za pozbawione bakterii, według aktualnej koncepcji może posiadać także własną mikrobiotę, nie stanowiącą zagrożenia dla rozwijającego się płodu. Widać w tym miejscu daleko idąca analogię z mikrobiotą jelit, które reagują objawami chorobowymi tylko na obecność pewnych patogenów, rozpoznawanych przez układ immunologiczny jelit. Czyżby podobna sytuacja istniała także w odniesieniu do mikrobioty dróg rodnych i jamy macicy, czyli tylko groźne patogeny byłyby w stanie wywoływać odpowiedź zapalną stymulującą przedwczesną akcję porodową? Recenzent wysoko ocenia zestaw informacji przedstawionych przez doktorantkę w tym fragmencie dysertacji.

W rozdziale opisującym potencjalne czynniki mające wpływ na wyzwolenie przedwczesnej akcji porodowej doktorantka wymienia prozapalne cytokiny takie jak IL-6 czy TNF- α , a także CRP, niskie wartości stężenia hemoglobiny czy podwyższone wartości leukocytozy. Doktorantka przedstawia też mechanizmy poprzez które, czynniki te wpływają na wystąpienie przedwczesnej akcji porodowej.

W kolejnym rozdziale lek. Alicja Harmoza stawia hipotezę, będącą celem jej badania, w której przyjmuje, że różnorodność i skład mikrobiomu kobiety ciężarnej ma istotny wpływ na wystąpienie przedwczesnej akcji porodowej.

W rozdziale dotyczącym metodologii badania mikrobiomu doktorantka wymienia kryteria włączenia ciężarnych do grupy analizowanej w aspekcie stawianej przez nią hipotezy. W tabeli nr 7 wątpliwości recenzenta budzi informacja o braku interwencji terapeutycznej w przypadku porodu przedwczesnego wśród kryteriów włączenia. Jak należy rozumieć brak interwencji w sytuacji, gdy dochodzi do rozpoczęcia się przedwczesnej akcji porodowej? Czy powodem przedwczesnego urodzenia się dziecka były zawsze sytuacje nagłe, wymagające natychmiastowego działania takie jak np. odklejanie się łożyska? Treść ostatnich dwóch przedziałów w tej tabeli wymaga według recenzenta dodatkowych wyjaśnień.

Odnosząc się do rozdziału dotyczącego metod analitycznych, wykorzystanych w badaniu mikrobiomu, recenzent przyznaje, iż nie posiada wystarczającej wiedzy na temat stosowania metod wykorzystujących sztuczną inteligencję przy ocenie dużej ilości

danych i ustalaniu algorytmów, aby mógł oceniać poprawność stosowanych metod obliczeniowych. W tej sytuacji opiera się na opinii promotora pracy, który dysertację dopuścił do oceny przez zewnętrznych recenzentów.

Rozdział „Wyniki” został przedstawiony w sposób szczegółowy a jednocześnie przejrzysty i czytelny. Umieszczone w tekście zarówno ryciny oraz tabele ułatwiają percepcję wielu danych stanowiących treść badania naukowego. Drobna uwaga, dotycząca tabeli nr 10, dotyczy zmiany jej tytułu a także zwrócenie uwagi na niektóre treści w niej zawarte: wartości mediany Study Group wydają się być zamienione z wartością SD a w rubryce dotyczącej zaawansowania ciąży, wartości minimalne są większe od maksymalnych. Podobny problem dotyczący właściwego tytułu odnosi się do tabeli 11, w której prezentowane są dane dotyczące obu badanych grup.

Oceniając interpretację wyników oznaczeń CRP, recenzent uważa, iż zbyt mała liczba analizowanych przypadków oraz znaczne rozbieżności w uzyskanych danych, nie uprawniają do wyciągania wniosków dotyczących zależności pomiędzy wartościami CRP a „pregnancy outcome” czy „timing of delivery”. Ponadto, nie jest wyjaśnione przez doktorantkę co kryje się pod określeniem „pregnancy outcome”. Jest sprawą oczywistą, że porody przedwczesne często kojarzą się z podwyższoną odpowiedzią zapalną u ciężarnych. W tym przypadku, jednak nie odnotowano istotnej różnicy w wartościach liczby leukocytów pomiędzy ciężarnymi, które urodziły przedwcześnie a rodzącymi o czasie. Można zatem przypuszczać, że to nie występująca infekcja, która powinna spowodować wzrost liczby leukocytów u matki, była bezpośrednią przyczyną porodu przedwczesnego. Podobnie, dane dotyczące wartości hemoglobiny, hematokrytu czy liczby płytek krwi a także wartości stężenia białka oraz liczby leukocytów w moczu nie miały istotnego wpływu na wystąpienie porodu przedwczesnego.

Kolejny fragment danych dotyczący tabel uzyskanych w trakcie analizy „Machine Learning” jest imponujący, aczkolwiek nie do końca zrozumiały dla recenzenta, mającego skromne doświadczenie w zakresie zastosowanych przez doktorantkę metod analizy danych. Natomiast tabele przedstawiające zmienność gatunkową bakterii w próbkach stolca uzyskanego w obu grupach badanych, wyraźnie wskazują na większą różnorodność (diversity) bakterii w grupie matek, u których poród wystąpił w terminie zakończenia ciąży. Podsumowując ten fragment należy podkreślić istotną wartość prezentowa-

nych przez doktorantkę wyników, które są interesujące, jasno przedstawione i stanowią czytelne tło do dyskusji.

Kolejny rozdział pracy zatytułowany „Dyskusja” jest wzorowy pod względem zarówno zakresu wiedzy jak i sposobu prowadzenia analizy porównawczej uzyskanych przez siebie wyników z danymi przedstawionymi w piśmiennictwie. Doktorantka podkreśla zgodność własnych rezultatów badania z danymi opublikowanymi na ten temat przez innych autorów. W dalszym toku dyskusji, lek. Alicja Harmoza porównuje metody i procedury zastosowane przez innych autorów z własnymi wykorzystanymi w badaniu i podkreśla istotny wpływ, poza sposobem pozyskiwania próbek, także różnych innych czynników, które wymienia, na ostateczne wyniki badania. Aczkolwiek recenzent nie jest pewien czy zasadnym jest przedstawianie w dyskusji różnic w metodach pobierania wydzieliny z pochwy i szyjki macicy, skoro doktorantka nie wykonywała analizy takiego materiału biologicznego w swoim badaniu.

Ciekawym fragmentem dyskusji są podrozdziały, w których doktorantka pokazuje silne i słabsze strony badania, co świadczy o krytycznej ocenie uzyskanych w trakcie analizy wyników. W opinii recenzenta, tzw. słabszym punktem badania jest przede wszystkim relatywnie mała liczebność grupy, która uniemożliwiła zapewne uzyskać statystycznej znamienności w porównywaniu kilku analizowanych czynników. W podrozdziale dotyczącym praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników, doktorantka cytuje ostatnich kilka publikacji, które wykazały istotny wpływ interwencji w skład mikrobiomu na stan zdrowia w różnych zaburzeniach zdrowia człowieka.

Cały rozdział świadczy o obszernej wiedzy doktorantki na temat związany z jej badaniem naukowym, a także o zdolności analitycznego myślenia i właściwego wyciągania wniosków. Recenzent gratuluje doktorantce ciekawego pomysłu badawczego a także odwagi i umiejętności prowadzących do wykorzystania w analizie wyników metod tzw. „sztucznej inteligencji”, które coraz częściej stają się przydatne w ocenie znacznej ilości danych, uzyskanych w trakcie badań.

Chciałbym też zachęcić lek. Alicję Harmozę do kontynuacji badania na znacznie większej grupie populacyjnej. Co więcej, przyjmując, że ostateczna wersja mikrobiomu człowieka powstaje w pierwszych dwóch latach życia, sugeruję, aby w przyszłych analizach wziąć pod uwagę zarówno rodzaj porodu jak i sposób odżywiania w pierwszych

miesiącach życia. Być może już wtedy powstaje odmienna „diversity” mikrobiomu, która utrzymuje się przez następny okres życia i wpływa na nasze zdrowie w dorosłości. Interwencja w skład mikrobiomu w dwóch pierwszych latach życia, być może byłaby łatwiejsza i bardziej skuteczna, a poza tym oddziaływanie mikrobiomu trwałoby od pierwszych lat i chroniłoby nasze organizmy przed niekorzystnymi skutkami nieprawidłowo zróżnicowanej mikrobioty.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, iż doktorantka opracowała interesujący temat, którego dalsze odsłony pozwolą być może na interwencję przynoszącą praktyczne możliwości poprawy funkcjonowania np. naszej osi jelitowo-mózgowej. Praca wskazuje na dojrzały sposób przedstawiania wyników uzyskanych w drodze badań naukowych, zasługuje zatem na dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego o co zwracam się uprzejmie do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy.



Kraków, dnia 26.04. 2023 r.

Prof. dr hab. med. Ryszard Lauterbach

