

Gdańsk, dnia 13 .07. 2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Barbara Kamińska
Emerytowany Kierownik Katedry i Kliniki Pediatrii,
Gastroenterologii, Alergologii i Żywienia Dzieci
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Tel. 058 76 40 440
bkam@gumed.edu.pl

Recenzja

**pracy na stopień doktora nauk medycznych
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne
lek. med. Anny Marii Gładkiej**

Obecność bakterii *Helicobacter pylori* w ślinie u dzieci szkolnych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Maciorkowska

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Izabela Roszko-Kirpsza

Rozpowszechnienie zakażenia *H. pylori* w populacji ludzkiej szacuje się średnio na około 50% i uważa za jedno z najczęstszych zakażeń bakteryjnych u ludzi. Częstość zakażenia jest porównywalna u płci żeńskiej i męskiej, zwiększa się z wiekiem i nasila się znacznie w drugiej dekadzie życia. Człowiek jest głównym rezerwuarem tego drobnoustroju, a zakażenie szerzy się za pośrednictwem wydzielin (ślina, wymiociny) oraz wydaliny drogą oralno-oralną i fekalno-oralną.

Droga pokarmowa jest najpopularniejszą drogą rozprzestrzeniania się zakażenia. Do zakażenia dochodzi również poprzez bezpośredni kontakt ze śliną nosiciela - picie ze wspólnych butelek, jedzenie z jednego talerza, używanie jednego kompletu sztućców czy przez jedzenie brudnymi rękoma. W świetle żołądka *Helicobacter pylori* penetruje warstwę śluzową okolicy przedodźwiernikowej i przylega ściśle do powierzchni komórek nabłonkowych śluzówki.

Produkuje enzym ureazę, dzięki któremu rozkłada mocznik do zasadowego amoniaku, neutralizując kwaśny sok żołądkowy. Wyższe pH środowiska stwarza dogodniejsze warunki do bytowania i rozwoju bakterii, która w szybkim tempie namnaża się, migruje i zasiedla kolejne

rejony śluzówki żołądka. Jest ono istotną przyczyną choroby wrzodowej żołądka i/lub dwunastnicy oraz raka żołądka,.

Bakterie są bardzo ruchliwe, mogą poruszać się w warstwie śluzu i przetrwać w zmieniającym się środowisku żołądka – odgrywa tu znaczącą rolę spiralny kształt oraz obecność rzęsek. Wydaje się ważna, na co wskazuje autorka, analiza roli i miejsca jakie ma w tym procesie jama ustna.

Zakażenie bakterią *H. pylori* może być diagnozowane metodami nieinwazyjnymi oraz inwazyjnymi. Aktualnie złotym standardem w rozpoznawaniu zakażenia *Helicobacter pylori* w populacji dziecięcej jest metoda inwazyjna - badanie gastroscopowe z biopsją, wykonanie testu ureazowego oraz badania histopatologicznego lub hodowli bakteryjnej. Metody nieinwazyjne - ureazowy test oddechowy oraz monoklonalny test kałowy ELISA są zalecane raczej do kontroli eradycji niż rozpoznawania zakażenia.

Pojawiają się także doniesienia o wykorzystaniu śliny w diagnostyce zakażenia, ponieważ jest dobrym materiałem do pobierania i przechowywania. Zaletą jest pozyskiwanie w sposób nieinwazyjny i możliwość wielokrotnego pobierania, brak stresu dla pacjenta, mniejsze koszty badania, łatwa dostępność do badań klinicznych i laboratoryjnych. Umożliwia to przeprowadzenie analiz wśród dużej populacji osób, a co istotne u dzieci.

Ogólne czynniki ryzyka zakażenia to wiek dziecięcy, niski status socjoekonomiczny, złe warunki sanitarne, nieprawidłowe nawyki higieniczne. Potwierdzeniem tej tezy jest większe rozpowszechnienie zakażenia w krajach rozwijających się, a mniejsze w krajach rozwiniętych.

Brak aktualnie odpowiedniego testu ze śliny, który mógłby służyć w diagnostyce u pacjentów z objawami dyspeptycznymi przed skierowaniem ich na gastroscopię lub jako badanie zastępujące endoskopię. Niestety dotychczas dostępne testy nie są wystarczająco dokładne, by mogły być zastosowane w warunkach klinicznych do diagnozowania zakażenia.

Temat pracy doktorskiej lek. Anny Gładkiej uważam za bardzo aktualny i ważny, zarówno w aspekcie naukowo-poznawczym jak też praktycznym, a tym samym w pełni uzasadniony w szeroko rozumianym problemie diagnostyki i leczenia infekcji wywołanej przez bakterię *Helicobacter pylori*, a szczególnie, co wydaje się ważne podkreślenia, że badania doktorantki dotyczą dzieci. Nadmienić należy, że temat zakażenia bakterią Hp u dzieci jest niezwykle starannie opracowywany w materiale u dzieci hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia i Alergologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku, a promotor tej dysertacji Prof. dr hab. Elżbieta Maciorkowska ma

w swoim dorobku, kilkadziesiąt publikacji począwszy od 1998 r. na temat bakterii *Helicobacter pylori*.

Przedstawiona mi do oceny praca wyróżnia się niezwykle staranną formą i ma układ typowy dla prac doktorskich.

Poszczególne rozdziały i ich rozwinięcie pozwalają recenzentowi w sposób prosty i logiczny analizować dysertację.

Praca obejmuje: 90 stron tekstu, w tym 156 pozycji cytowanego piśmiennictwa w języku polskim i angielskim, pozycje piśmiennictwa ułożone wg cytowań, niezwykle starannie i co należy podkreślić aktualne, obejmujące głównie ostatnią dekadę. Literatura w tekście prawidłowo cytowana.

Układ pracy jest klasyczny i obejmuje: Wykaz skrótów (str. 4- 5), Wstęp I oraz od części II – V zawierające charakterystykę bakterii Hp. , epidemiologię, zmiany w jamie ustnej (str. 6-31), Założenia i cel pracy (str. 32-33), Metody badawcze (str. 33-36), Omówienie wyników badań (str. 37-48), Dyskusję (str. 49-66), Wnioski (str. 67), Streszczenie w języku polskim i angielskim (str. 68- 73), Piśmiennictwo (str. 74 - 87), Wykaz tabel i rycin (str. 88- 89), Aneks str. 90

We wstępie doktorantka wprowadza czytającego, a tym samym prowadząc do celu swoich badań, w temat znanej, ale ciągle „odkrywanej” w różnych konstelacjach bakterii *Helicobacter pylori*.

W II części wstępu omawia charakterystykę bakterii *Helicobacter pylori* poprzedzoną opisem stanu epidemiologii bakterii na podstawie cytowanej literatury w Polsce i na świecie w różnych grupach wiekowych. Obserwowana, ale jeszcze w nielicznych badaniach, tendencja spadkowa liczby zakażeń, nie może jednak uspić czujności prowadzenia dalszych badań nad tą bakterią i poszukiwać optymalnych, nieinwazyjnych metod diagnostycznych mających na celu wykrycie zakażenia Hp. szczególnie w grupie dzieci i młodzieży.

Doktorantka powołując się na bardzo aktualne doniesienia dotyczące dzieci i młodzieży, gdzie w analizie opublikowanej w 2021 roku autorzy zwracają uwagę na obserwowaną w ostatnich latach mniejszą częstość występowania infekcji *Helicobacter pylori* w tej grupie wiekowej.

Wśród dzieci z dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego zakażenie tą bakterią oszacowano na całym świecie na 39%, aczkolwiek wskaźniki wykrywalności są bardzo zróżnicowane, wahają się od 3 do 76% w zależności od kraju i metody diagnostycznej

Park JS, Jun JS, Seo JH, Youn HS, Rhee KH. Changing prevalence of Helicobacter pylori infection in children and adolescents. Clin Exp Pediatr. 2021 Jan;64(1):21-25.

Jama ustna to miejsce, gdzie biofilm jest powszechny, a płytka nazębna stanowi mikroaerofilne środowisko. Young i wsp. w badaniu z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazali obecność spiralnych i kulistych form bakterii, które mogą być obecne w jamie ustnej nawet przy ujemnym wyniku hodowli . cytata autorki: poz 28. *Young KA, Allaker RP, Hardie JM. Morphological analysis of Helicobacter pylori from gastric biopsies and dental plaque by scanning electron microscopy. Oral Microbiol Immunol. 2001 Jun;16(3):178-181.*

W diagnostyce zakażenia H. pylori stosowane są metody biomolekularne, a materiałem pobranym do badań może być ślina, sok żołądkowy lub kał. Metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) charakteryzuje się dużą czułością i swoistością, często jest wykorzystywana w badaniach naukowych, ale z uwagi na wysoki koszt i ograniczoną dostępność nie jest włączona do standardów diagnostycznych, o czym wspomniała Doktorantka we wstępie, cytując również doniesienia o wykorzystaniu śliny w diagnostyce zakażenia, ponieważ jest dobrym materiałem do pobierania i przechowywania. Zaletą jest pozyskiwanie w sposób nieinwazyjny i możliwość wielokrotnego pobierania, brak stresu dla pacjenta, mniejsze koszty badania, łatwa dostępność do badań klinicznych i laboratoryjnych.

Autorka stwierdza omawiając tę część wstępu, że...” Takie metody byłyby przydatne szczególnie w pediatrii – gdzie inwazyjną gastroskopię często wykonuje się w znieczuleniu ogólnym. Ponieważ zakażenie prawdopodobnie nabywane jest we wczesnym dzieciństwie, istnieje potrzeba szybkiego, nieinwazyjnego, bezbolesnego badania u coraz mniejszych dzieci z objawami dyspeptycznymi w wywiadzie.”

Jako recenzent, uważam, że to bardzo ważne stwierdzenie powinno znaleźć swoje miejsce w dyskusji i zapewne we wnioskach.

III część wstępu wskazuje na źródła i drogi szerzenia zakażenia *Helicobacter pylori* . Już na wstępie podkreśla , a właściwie przypomina nam, lekarzom pediatrom, stomatologom, gastroenterologom, że zakażenie *Helicobacter pylori* szerzy się przez kontakty międzyludzkie na drodze oralno-oralnej, gastro-oralnej i fekalno-oralnej. W każdej z wymienionych trzech dróg transmisji zakażenie następuje przez jamę ustną. Za najczęstszą drogę przenoszenia infekcji H. pylori uznaje się ustno-ustną, a do zakażenia dochodzi zwykle we wczesnym dzieciństwie w obrębie własnej rodziny. Ta droga transmisji zależy od czynników środowiskowych, przyczyną jest brak dostatecznej higieny jamy ustnej, używanie wspólnych naczyń i sztućców, dzielenie łóżka lub sypialni z zakażoną osobą.

Przegląd piśmiennictwa dokonany przez Doktorantkę, a dotyczący się dróg szerzenia zakażenia, uważam za bardzo wnikliwy, dociekliwy i wskazuje jak wiele możliwości ma

bakteria Hp w dotarciu do „celu”. To bardzo praktyczne i pouczające wskazówki w diagnostyce i leczeniu tej infekcji.

IV część wstępu - Ślina jako rezerwuuar *Helicobacter pylori*, powinna przybliżyć czytającemu szlak dochodzenia do celu pracy, a mianowicie odpowiedzi na pytanie/problem postawiony w tytule dysertacji- *Obecność bakterii Helicobacter pylori w ślinie u dzieci szkolnych.*

Stwierdzam jednak, że ta część wstępu powinna być połączona z II częścią wstępu.

Trudno mnie było doszukać się zapewne tego, co autorka w tej części chciała omówić- a mianowicie ŚLINA, rezerwuuar, Helicobacter pylori.!

Ogólne czynniki ryzyka zakażenia to wiek dziecięcy, niski status socjoekonomiczny, złe warunki sanitarne, nieprawidłowe nawyki higieniczne. Znaczenie ma także przebywanie w skupiskach ludzkich. Najważniejszym jednak czynnikiem ryzyka może być zamieszkiwanie z osobą zakażoną. *Ostrowski B i wsp. Zapadalność i czynniki ryzyka infekcji Helicobacter pylori wśród krewnych pacjentów zakażonych. Pediatr Med Rodz 2017, 13 (3), 377-383.*

Autorka następnie dokonuje w tej części posumowania i podaje:...

„Podsumowując, rola obecności *Helicobacter pylori* w jamie ustnej nie jest wyjaśniona, istotne jest, aby ostatecznie ustalić, czy ślina jest rezerwuarem bakterii. Drugą ważną kwestią jest opracowanie testu z wykorzystaniem śliny. Takie badanie może znacznie ułatwić diagnostykę, zwłaszcza u najmłodszych pacjentów, a wczesna diagnoza może pomóc w zapobieganiu rozwojowi przewlekłego zakażenia *H. pylori* u dzieci”.

Ostatnie zdania podsumowujące przez Autorkę tę ważna i zasadniczą część pracy, wg mojej oceny też powinny znaleźć się w dyskusji/wnioskach.

V część wstępu - Występowanie zmian zapalnych w jamie ustnej u dzieci zakażonych *Helicobacter pylori* w której Doktorantka zmierza do wyznaczenia sobie celu pracy. Autorka na podstawie doniesień z piśmiennictwa podkreśla, że wykrycie obecności bakterii *H. pylori* w jamie ustnej skłoniło naukowców do kolejnych badań. Pojawiło się pytanie, czy istnieje związek między obecnością bakterii w jamie ustnej a stanem zapalnym błony śluzowej żołądka i czy ten sam szczep znajduje się w ślinie lub płytce nazębnej oraz w żołądku. Opublikowane wyniki dotychczas przeprowadzonych badań bywają rozbieżne, jak twierdzi autorka, aczkolwiek wykazuje się Ona ostrożnością i przytacza konkluzje badań, że może to wynikać ze stosowania różnych metod diagnostycznych. Uwaga Doktorantki bardzo słuszna! Obecność *Helicobacter pylori* zwiększa stan zapalny jamy ustnej i pogarsza stan uzębienia, a także próchnicę, w szczególności u dzieci.

To bardzo ważny temat i dobrze, że autorka cytując publikacje z analizą tego tematu, wyraża swoją chęć na polemikę z tezami/wnioskami zawartymi w tych doniesieniach przedstawiając swoje badania i wynikające z nich wnioski.

To doskonale przejście do dalszych rozdziałów dysertacji.

Doktorantka cytuje w tej części 13 publikacji- bardzo bogaty materiał do polemiki, który wskazuje, że wyniki badań są zróżnicowane, a wnioski często rozbieżne. Wykrycie H. pylori w jamie ustnej bez obecności w żołądku jest przez jednych autorów uważane za brak korelacji a przez innych jako początek infekcji lub możliwość fałszywego wyniku z powodu tworzenia biofilmu.

Pozostaje nadal wiele pytań dotyczących zakażenia jamy ustnej, mechanizmów transmisji, korelacji z infekcją błony śluzowej żołądka oraz wpływu na bakterię bytującą w ślinie eradykacji systemowej czy zabiegu usunięcia płytki nazębnej. Ta część wstępu jest ciekawa, logicznie przedstawiona, a mnie jako pediatrze i gastroenterologowi pozwala poszerzyć wiedzę na problem infekcji bakterią *Helicobacter pylori*.

Autorka podaje, że ...”należy wykonać więcej badań w populacji wieku rozwojowego, zwłaszcza że do zakażenia dochodzi zwykle we wczesnym dzieciństwie, dlatego też najlepiej byłoby ocenić koincydencję zmian zapalnych w błonie śluzowej żołądka i obecności *Helicobacter pylori* w jamie ustnej na wczesnym etapie infekcji...”

To ostatecznie, wyżej cytowane zdanie, umieściłabym nie we wstępie, ale w dyskusji.

Analizując ten rozdział uważam, że poruszane przez lek. Annę Marię Gładką zagadnienia, których omówienie ma prowadzić czytającego do założonego w badaniu celu pracy spełnia w pełni swoje zadanie. Literatura wstępu przekonująco prowadzi do wytyczonych przez doktorantkę celów pracy.

Rozdział VI to założenia i cel pracy, które zostały przedstawiony jasno i precyzyjnie.

Cel główny pracy lek. Anny Marii Gładkiej jest zawarty w hipotezie badawczej, która zakłada:

Obecności *Helicobacter pylori* w treści żołądkowej i/lub błonie śluzowej żołądka co wiąże się z istnieniem stanu zapalnego oraz chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy. Obecność H. pylori w ślinie u dzieci szkolnych stanowi kolejny ważny temat dotyczący roli tej bakterii w patologii jamy ustnej poczynając już od okresu wieku rozwojowego. W grupie badanych dzieci z potwierdzonym zakażeniem błony śluzowej żołądka wykonano badanie metodą łańcuchowej

reakcji polimerazowej (PCR) poszukując alleli s1 oraz s2 genotypu vacA genomu *H. pylori* w próbkach śliny oraz w wycinkach z błony śluzowej żołądka.

Po uzyskaniu wyników Doktorantka postanawia ustalić:

1. Czy ślina jest rezerwuarem *Helicobacter pylori*?
2. Czy obecność bakterii *H. pylori* w ślinie koreluje z zakażeniem błony śluzowej żołądka?
3. Czy istnieje związek między określonym genotypem bakterii w błonie śluzowej żołądka a objawami klinicznymi?
4. Czy obecność bakterii *H. pylori* w ślinie u dzieci szkolnych ma związek z występowaniem próchnicy?

Rozdział VII. Metody badawcze

W poszczególnych podrozdziałach doktorantka zamieszcza bardzo szczegółowy opis zastosowanych w pracy metod badawczych.

7.1. Badana populacja

Przedmiot badań stanowiły dzieci hospitalizowane w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia i Alergologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku, którym wykonano badanie gastroskopowe z powodu objawów dyspeptycznych (ból brzucha, utrata łaknienia), niedoboru masy ciała oraz z powodu przewlekłej niedokrwistości. Program badań obejmował badanie kwestionariuszowe, pobranie śliny niestymulowanej oraz badanie stomatologiczne.

7.2. Badanie kwestionariuszowe

Kwestionariusz autorstwa własnego obejmował pytania dotyczące wywiadu rodzinnego (wiek rodziców i rodzeństwa, zakażenie *H. pylori* domowników), objawów klinicznych u dziecka, pomiarów antropometrycznych, wyników badań laboratoryjnych, ambulatoryjnych badań w kierunku zakażenia *H. pylori*, stosowanych przed gastroskopią leków blokujących pompę protonową oraz ewentualnego przebytego wcześniej zakażenia *Helicobacter pylori* i leczenia.

Uważam, że kwestionariusz powinien być załączony w aneksie. To przecież ważny aspekt dysertacji na którym opiera się wielokrotnie Doktorantka.

7.3. Pobranie śliny

Wszystkim dzieciom objętym badaniami została pobrana ślina niestymulowana w ilości 3 ml w godzinach porannych (na czczo, przed porannym myciem zębów) do jałowego plastikowego pojemnika, następnie podzielona na porcje i zamrożona w temperaturze -80 st.C.

7.4. Ocena stomatologiczna

Wszystkie dzieci miały wykonane przez lekarza stomatologa badanie oceniające stan zdrowia jamy ustnej. Lekarz stomatolog nadzorował również pobranie śliny i jej dalsze przechowywanie do badań.

7.5. Ocena endoskopowa i histopatologiczna błony śluzowej żołądka

Wszystkim dzieciom z utrzymującymi się objawami dyspeptycznymi wykonano badanie gastroscopowe z testem ureazowym oraz badaniem histopatologicznym.

Badanie endoskopowe górnego odcinka przewodu pokarmowego wykonano w Pracowni Endoskopowej Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia i Alergologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Z części przedodźwiernikowej pobrano wycinki na szybki test ureazowy (GOLD Hpdry, GrupoBios S.A., Chile).

Do oceny histopatologicznej pobierano dwa wycinki błony śluzowej z części przedodźwiernikowej, trzonu żołądka oraz z miejsc zmienionych chorobowo. (*chyba ...po 2 wycinki z każdej części?*)

Ocenę histopatologiczną błony śluzowej żołądka wykonano w Akademickim Ośrodku Diagnostyki Patomorfologicznej i Genetyczno-Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

7.6. Izolacja DNA *Helicobacter pylori* ze śliny i z błony śluzowej żołądka

Oznaczenie alleli *s1* i *s2* genotypu *vacA* genomu *H. pylori* wykonano w Zakładzie Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Specyficzne sekwencje genomowe *H. pylori* wykryto w DNA wyekstrahowanym z próbek śliny oraz skrawków z wycinków błony śluzowej żołądka zabezpieczonych w parafinie (FFPE) uzyskanych od każdego z dzieci z grupy badanej z potwierdzoną infekcją *H. pylori*.

(dokładna procedura badania zawarta jest na str. 35-35 dysertacji).

Badania wykonano dzieciom po uzyskaniu wcześniejszej dobrowolnej, świadomej, pisemnej zgody rodziców lub ich opiekunów prawnych oraz zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, numer zgody: R-I-002/46/2018 (Aneks).

7.7. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Do opisu zmiennych ciągłych charakteryzujących grupy badane zastosowano wartości średnich z odchyleniami standardowymi. Do oceny rozkładu parametrów zastosowano test Shapiro-Wilka. Do porównania cech skategoryzowanych używano testu χ^2 . Zależność między wystąpieniem zakażenia *H. pylori* a wiekiem rodzica była oceniona metodą regresji logistycznej. Do obliczeń statystycznych wykorzystano oprogramowanie STATA w wersji 10.0. Wartości poniżej 0,05 były uważane za istotne statystycznie.

W poszczególnych podrozdziałach doktorantka zamieszcza szczegółowy opis zastosowanych w pracy metod badawczych. Analiza rozdziału o metodach badawczych pozwala czytającemu bez trudu przejść do analizy dalszych części pracy.

Rozdział VIII. Omówienie wyników badań - przedstawia wyniki analizowanego materiału, ich omówienie i jest mocnym atutem pracy zawartym na 12 stronach, pozbawionych jednak, wg recenzenta, dokładniejszego, jasnego opisu badanych grup. Dokładniej przedstawię moje spostrzeżenia po omówieniach części pracy.

8.1. Charakterystyka badanej grupy

Badaniami objęto 116 dzieci w wieku od 4 lat i 6 miesięcy do 17 lat i 10 miesięcy. Wśród badanych było 66,4% dziewczynek oraz 33,6% chłopców. W mieście mieszkało 65,5% dzieci, zaś na wsi 34,5% dzieci. Grupę badaną Hp(+) stanowiło 37,9% dzieci, grupę kontrolną Hp(-) stanowiło 61,5% dzieci. Szczegółowe dane badanej grupy z podziałem na płeć i miejsce zamieszkania przedstawia Tabela 1.

8.1.4. Objawy kliniczne u badanych dzieci

Spośród objawów zgłaszanych przez dzieci ze stwierdzonym zakażeniem *H. pylori* dominującymi były bóle brzucha występujące u 84,1%. W grupie dzieci bez zakażenia odsetek bólów brzucha sięgał 97,2% i był to powód wykonania badania gastroscopowego. Utrata łaknienia stwierdzana była u 54,5% dzieci z zakażeniem oraz u 55,6% dzieci bez obecności *H. pylori* w żołądku. Objawy choroby refluksowej stwierdzano u 36,4% badanych zakażonych i 45,8% dzieci bez zakażenia. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie jeżeli chodzi o występowanie objawów klinicznych w badanych grupach. Tabela 4.

W tabelach, dla większej jasności dla czytającego, opisywana GRUPA BADANA – dodałabym oznaczenie Hp(+) i podobnie we wszystkich tabelach w których są podane wyniki GRUPY BADANEJ. Praktycznie Doktorantka badała obie grupy, czyli obie były grupami badanymi. Badania genotypu przeprowadzała w grupie Hp(+) zgodnie z tematem dysertacji.

8.2. Badanie genotypu *vacA* genomu *Helicobacter pylori* w ślinie i błonie śluzowej żołądka

Oba allele były obecne u 31,6% pacjentów (allel *s1* i allel *s2*). Występowanie allelu *s1* w ślinie dzieci zakażonych było istotnie statystycznie częstsze niż allelu *s2* ($p=0,011$). Tabela 5

Badanie genotypu w błonie śluzowej żołądka (badanie PCR genotypu *vacA* genomu *H. pylori* w błonie śluzowej żołądka), wykonano u 93,2% dzieci zakażonych, materiał genetyczny wykryto u 65,9% badanych. U 34,1% nie wykryto żadnego z alleli. Allel *s1* wykryto w 61,0% przypadków, allel *s2* u 26,8% przypadków. U 22% pacjentów występowały obydwie allele genu *vacA* *H. pylori*. Tabela 6.

8.3. Występowanie genotypu *vacA* genomu *Helicobacter pylori* a objawy kliniczne

Nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie pomiędzy obecnością genotypu *vacA* genomu *H. pylori* w bioptacie śluzówki żołądka a występowaniem objawów klinicznych u badanych dzieci. Szczegółowe dane przedstawia Tabela 7.

Ze względu na małą liczebność grupy (2 pacjentów) posiadającej wyłącznie allel *s2* w błonie śluzowej żołądka (bez obecności allelu *s1*), nie była możliwa analiza statystyczna objawów klinicznych w zależności od obecności w błonie śluzowej żołądka poszczególnych badanych alleli (allel *s1* lub allel *s2*).

8.4. Występowanie próchnicy u badanych dzieci

Badaniem genotypu *vacA* genomu *Helicobacter pylori* w ślinie oraz w w bioptacie żołądka i nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zależności od liczby badanych alleli w bioptacie śluzówki żołądka w odniesieniu do wskaźnika PUW (suma zębów próchnicowych (P), usuniętych (U) i wypełnionych (W) u danego pacjenta). Nie stwierdzono istotnie częstszego występowania w śluzówce żołądka jednego z alleli (*s1* lub *s2*) w grupach pacjentów z różnymi wskaźnikami. Tabela 11.

Str.45-46 błąd numeru tabeli. „Tabela 10 przedstawia odsetek pacjentów w poszczególnych badanych grupach. Nie stwierdzono istotnych różnic w wartości wskaźnika PUW między grupą badaną a kontrolną ($p= 0,561$). Ta ocena przedstawiona jest w tabeli 9.

8.5. Występowanie badanych alleli genotypu *vacA* genomu *Helicobacter pylori* w ślinie i błonie śluzowej żołądka u dzieci zakażonych

W grupie 37 pacjentów badanych udało się uzyskać oznaczenie genetyczne allelu *s1* i *s2* w ślinie i w błonie śluzowej żołądka. Stwierdzono istotnie częstsze występowanie allelu *s1* w ślinie i w błonie śluzowej żołądka jednocześnie u dzieci zakażonych *H. pylori* w porównaniu z częstością występowania allelu *s2* w obu tych miejscach równocześnie. (Tabela 12).

Autorka omawia w tym ważnym rozdziale, dążąc do podsumowania, poszczególne zależności, analizowane cechy i parametry ujmując je w czytelnych 12 tabelach i 2 rycinach.

Wyniki badań przedstawione w dysertacji zawierają wiele istotnych stwierdzeń prawidłowo opracowanych w analizie statystycznej. Z punktu widzenia praktycznego klinicysta zwróci zapewne uwagę na kilka spostrzeżeń zawartych w tym rozdziale pracy.

Uważam, że po uwzględnieniu uwag recenzenta dotyczącego dokładniejszej, głównie w nazewnictwie formy, rozdział omawiający wyniki badań wzbogaci się o większą jasność przekazu.

Rozdział IX Dyskusja, z dobrze dobranymi publikacjami jest bardzo trafna i pokazuje czytającemu umiejętność doktorantki w doborze piśmiennictwa i prawidłowego jego cytowania. W przeprowadzonej **dyskusji (18 stron)**, autorka analizując badania własne i cytowaną literaturę zawiera stwierdzenia, w których zawarta jest kwintesencja przeprowadzanych badań i analiz- wycucie problemu i wieloaspektowych zależności. Na podstawie kilku publikacji analizujących epidemiologię zakażenia Hp., autorka wyraźnie stwierdza, że zakażenie *H. pylori* obecnie uważa się za jedno z najczęstszych zakażeń bakteryjnych u ludzi, rozpowszechnienie w całej populacji ludzkiej jest szacowane na około 50%. W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się zmniejszenie częstości infekcji *H. pylori*, zwłaszcza w krajach Ameryki Północnej i Europy Północnej. Stwierdza dalej, że obserwowane w Polsce zmniejszenie częstości zakażenia *Helicobacter pylori* może być wynikiem poprawy warunków socjoekonomicznych, większej dbałości o higienę, częstego stosowania antybiotyków i większej świadomości zakażeń rodzinnych *H. pylori*. W badaniu własnym wśród dzieci z objawami dyspeptycznymi zakażenie stwierdzono u 37,9% badanych. Zakażenie *Helicobacter pylori* u dzieci bardzo często przebiega bezobjawowo, zwłaszcza u najmłodszych. Objawy występują zazwyczaj dopiero gdy rozwinię się zapalenie błony

śluzowej żołądka czy choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy. Doktorantka przedstawia swoje obserwacje, ważne dla klinicysty, gastroenterologa i znane z codziennej praktyki, że w badaniu własnym spośród objawów zgłaszanych przez dzieci z zakażeniem *H. pylori* dominującymi objawami były bóle brzucha, utrata łaknienia, stwierdzano także objawy choroby refluksowej. Jednak żaden ze zgłaszanych objawów nie był istotnie statystycznie związany z występującym zakażeniem *H. pylori*, a zgłaszane dolegliwości bólowe brzucha były równie często spotykane w grupie dzieci bez infekcji ($p=0,010$).

I tutaj możemy popatrzeć na badania Doktorantki i rozpatrywać możliwość badania nieinwazyjnego śliny w przypadku takich pacjentów i traktować to jako wstępną i może decydującą metodę diagnostyki zakażenia *Hp* u wybranych dzieci.

W dyskusji Autorka dużo miejsca poświęciła badaniom genomu *Helicobacter pylori*, który stał się obiektem wielu badań, od roku 1997 opublikowano opisy kilku różnych genomów drobnoustroju z różnych rejonów świata. Badania wskazują, że genom *H. pylori* może być bardzo zróżnicowany w zależności od obszaru geograficznego, a wysoka różnorodność genetyczna przyczynia się do występowania różnych objawów infekcji.

W badaniach Doktorantki poszukiwano genomu bakterii w ślinie oraz wycinkach z błony śluzowej żołądka. Badanie PCR w ślinie wykonano u 86,4% pacjentów z grupy badanej oraz w przypadku 5,6% pacjentów z grupy kontrolnej. Obecność materiału genetycznego *H. pylori* stwierdzono u 81,6% pacjentów z grupy badanej, w tym allel s1 był obecny w 71,1% próbkach śliny, a allel s2 stwierdzono u 42,1% badanych. Oba allele jednocześnie były obecne u 31,6% pacjentów. Występowanie allelu s1 było istotnie statystycznie częstsze niż allelu s2 ($p=0,011$). W grupie kontrolnej wykonano badanie u 4 osób, u 2 z nich stwierdzono występowanie obu alleli w ślinie, natomiast u pozostałych 2 znaleziono w ślinie jedynie allel s2.

Jak w rozdziale wyników badań, Autorka uważa słusznie, że jest to za mała grupa badanych do oceny.

Goud i wsp. również uzyskali dodatni wynik obecności materiału genetycznego *H. pylori* w ślinie u pacjentów z wykluczonym zakażeniem żołądka oraz u osób bez zapalenia błony śluzowej żołądka w wywiadzie. Według autorów biofilm tworzony przez bakterie może utrudniać barwienie preparatów histopatologicznych i prowadzić do wyników fałszywie ujemnych. Autorzy uważają, że jama ustna może być początkowym miejscem zakażenia *H. pylori* a bakterie mogą pozostawać w jamie ustnej w małej ilości przez długi czas nie kolonizując żołądka. (*Goud EVSS et al. 2019*) poz w piśmiennictwie 88.

Temu zagadnieniu autorka poświęciła przeważającą część dyskusji, analizując badania własne i innych autorów. Odzwierciedleniem tej dyskusji jest ocena tej części dysertacji zawarta we wnioskach.

Dyskusja, szczególnie ta część poświęcona zagadnieniu genomu Hp, świadczy o dobrej znajomości tematu będącego przedmiotem pracy. Prowadzona w sposób logiczny, porządkująca tak wiele zgromadzonych danych pokazuje zdolność doktorantki do analizy danych z literatury i swoich własnych badań. Autorka w dyskusji wskazuje na możliwość poszukiwania, doskonalenia, rozszerzania metod diagnostycznych. A może ich uproszczenia i usystematyzowania oceniając przede wszystkim co ważne w pediatrii- ich nieinwazyjność?

Rozdział X: wnioski

Wnioski sformułowane przez doktorantkę wynikają z przeprowadzonych badań i stanowią głównie ich podsumowanie.

Brakuje recenzentowi jeszcze kilku wniosków, które pokażą praktyczną stronę przeprowadzonych badań i dadzą narzędzie w postaci badania nieinwazyjnego w diagnostyce zakażenia Hp u dzieci. z objawami ze strony przewodu pokarmowego.

Weześniej, w omówieniu przeze mnie wstępu, wskazałam sformułowane przez Autorkę fragmenty wstępu, które doskonale dają możliwość i zasadność do zamieszczenia niektórych z nich, we wnioskach.

Z obowiązku recenzenta w recenzji pracy zamieściłam uwagi, które zapewne pomogą doktorantce w przygotowaniu pracy do druku i co uważam, że wskażą lekarzom wartość uzupełnienia diagnostyki przewodu pokarmowego badaniem nieinwazyjnym jakim jest badanie śliny w kierunku zakażenia Hp. u dzieci.

Podsumowując – praca bardzo mi się podoba, ma wartość poznawczą i praktyczną. Napisana jest jasno i logicznie, wydana edytorsko bardzo dobrze. Opracowanie statystyczne bezbłędne. Grafika tabel i rycin z uwagami przy rozdziale.

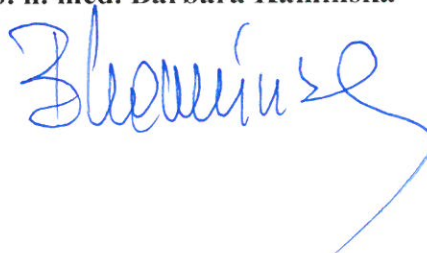
Ogólna ocena pracy na stopień doktora nauk medycznych lek. Anny Marii Gładkiej jest pozytywna.

W mojej opinii przedstawiona rozprawa lek. med. Anny Marii Gładkiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj.: Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. - przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 ze zm.) toteż zwracam

się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. med. Anny Marii Gładkiej do dalszych etapów postępowania.

RECENZENT

Prof. dr hab. n. med. Barbara Kamińska

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Barbara Kamińska', with a long, sweeping flourish extending to the right.