

AUTOREFERAT

Małgorzata Bernatek
Wydział Nauk o Zdrowiu
Akademii im Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego w Kaliszu

Kalisz 2023

1. Imię i nazwisko. Małgorzata Bernatek
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**
 - 2.1 2011 - Dyplom ukończenia Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - 2011
 - 2.2 Dyplom specjalisty w zakresie Chorób Wewnętrznych - 2018
 - 2.3 Stopień naukowy doktora nauk medycznych - 2019
3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**
 - 3.1 2020 – obecnie – Akademia Kaliska im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego w Kaliszu – Wydział Nauk o Zdrowiu, adiunkt
 - 3.2 2014 – obecnie – Poradnia Lekarza Rodzinnego
 - 3.3 2014-2017 – Zakład Higieny Katedry Medycyny Społecznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, stanowisko asystent
 - 3.4 2011 – obecnie – Szpital Powiatowy w Jarocinie Oddział Chorób Wewnętrznych, lekarz kontraktowy
4. **Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.**
 - 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Kolka jelitowa u niemowląt - diagnostyka i dobór optymalnej terapii probiotykowej”

- 4.2 Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe
- Rozprawę habilitacyjną tworzy monotematyczny cykl 5 prac. Ich łączna wartość współczynnika Impact factor wynosi 18,05 a suma punktów zgodnie z wykazem**

1. **Malgorzata Bernatek**, Wioletta Żukiewicz-Sobczak, Sabina Lachowicz-Wiśniewska and Jacek Piątek “Factors Determining Effective Probiotic Activity: Evaluation of Survival and Antibacterial Activity of Selected Probiotic Products Using an “In Vitro” Study”. *Nutrients* 2022, 14(16), 3323. <https://doi.org/10.3390/nu14163323>.

Impact Factor: 5,900

MNiSW: 140.00

2. **Bernatek Malgorzata**, Henning Sommermeyer, Andrzej Wojtyła, Sabina Lachowicz-Wiśniewska, Jacek Piątek, MD, “The factors determining effective probiotic activity - evaluation of survival and antibacterial activity of selected probiotic products: an "in-vitro" study”. *J Health Inequal* 2023; 9 (2). DOI: <https://doi.org/10.5114/jhi.2023.130528>

MNiSW: 100.00

3. **Bernatek Malgorzata**, Piątek Jacek, Pszczola Marcin, Krauss Hanna, Antczak Janina, Maciukajć Paweł, Sommermeyer Henning. „Nine-strain bacterial synbiotic improves crying and lowers faecal calprotectin in colicky babies: an open-label randomized study”. *Microorganisms* 2022, 10 (2) (430). DOI: [10.3390/microorganisms10020430](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020430)

Impact Factor: 4.500

Punktacja MEiN: 40.000

4. Piątek Jacek, **Bernatek Malgorzata**, Krauss Hanna, Wojciechowska Małgorzata, Chęcińska-Maciejewska Zuzanna, Kaczmarek Przemysław, Sommermeyer Henning. “Effects of a nine-strain bacterial synbiotic compared to simethicone in colicky babies: an open-label randomised study” *Beneficial Microbes*. 2021, 12 (3), 249-257
<https://doi.org/10.3920/BM2020.0160>

Impact Factor: 5.050

Punktacja MEiN: 70.000

5. Sommermeyer Henning, **Bernatek Malgorzata**, Pszczola Marcin, Krauss Hanna, Piątek Jacek. “Supporting the diagnosis of infantile colic by a point of care measurement of faecal calprotectin” *Frontiers in Pediatric*. 2022, 10 (978545). DOI: [10.3389/fped.2022.978545](https://doi.org/10.3389/fped.2022.978545)

Impact Factor: 2.600

Punktacja MEiN: 70.000

4.2.1 Omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego

Wprowadzenie

Mikrobiota jelitowa

Mikrobiota jelitowa człowieka to termin określający zbiorowość wszystkich żywych mikroorganizmów, które można znaleźć w świetle jelita człowieka. W jej skład wchodzi wiele różnych mikroorganizmów. Większość z nich to bakterie [1]. Jednak oprócz bakterii w świetle jelita można znaleźć również eukarionty (np. drożdże) [2,3] czy wirusy [4]. Całkowita masa bakterii mikrobioty jelitowej człowieka wnosi od 1 do 2 kg masy ciała i obejmuje od 500 do 1500 różnych gatunków. Całkowitą liczbę komórek bakterii żyjących w jelicie szacuje się na około 10^{14} , co stanowi 10-krotność liczby komórek ciała człowieka. Mikrobiom jelitowy obejmuje około 8 milionów różnych genów (geny wszystkich mikroorganizmów żyjących w jelicie), co stanowi 150-krotną liczbę genów człowieka. Nic więc dziwnego, że mikroflora jelita ma ogromny wpływ na nasz organizm a jej zaburzenia mogą mieć poważne konsekwencje zdrowotne. Z tego też powodu w ostatnich latach prowadzonych jest coraz więcej badań naukowych mających na celu pełne wyjaśnienie roli mikrobioty jelitowej w fizjologii naszego organizmu. Prowadzone są również liczne badania mające na celu wykorzystanie mikroorganizmów probiotycznych w terapii wielu schorzeń. Podczas gdy większość bakterii żyjących w jelicie człowieka jest korzystna dla gospodarza, możemy tam znaleźć również szereg mikroorganizmów potencjalnie patogennych.

Bakterie bytujące w jelicie człowieka konsumują część spożytego przez nas pokarmu, w zamian wspomagając funkcjonowanie organizmu gospodarza [5]. Bakterie mikrobioty jelitowej (i) pomagają w trawieniu niektórych składników diety człowieka, (ii) wytwarzają związki chemiczne (np. krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe) niezbędne w metabolizmie komórek nabłonka jelitowego, (iii) biorą udział w produkcji niektórych witamin (witaminy z grupy B czy witaminę K), (iv) zapobiegają namnażaniu się patogennych bakterii w świetle

przewodu pokarmowego a ponadto (v) są silnie zaangażowane w dojrzewanie i regulację układu odpornościowego człowieka. Każda mikrobiota jelitowa człowieka zawiera bakterie potencjalnie patogenne [6]. W normalnych warunkach wzrost bakterii patogennych jest hamowany, przez co manifestacja ich chorobotwórczego działania jest tłumiona. Ponieważ każdy wzrost liczby bakterii patogennych może prowadzić do powstania objawów chorobowych, niezwykle ważne jest, aby zapobiec ich niekontrolowanemu namnażaniu się. Bakterie komensalne mikrobioty jelitowej odpowiedzialne są za ograniczanie wzrostu bakterii patogennych. Ta funkcja bakterii komensalnych określona została w piśmiennictwie naukowym terminem „oporność kolonizacyjna” [7]. Aby zapewnić skuteczną oporność kolonizacyjną, w jelicie obecna musi być zróżnicowana i zrównoważona populacja bakterii komensalnych. Hamowanie bakterii patogennych przez bakterie komensalne obejmuje szereg różnych mechanizmów [8]. Wśród mechanizmów tych wymienić należy między innymi produkcję przez te mikroorganizmy kwasów organicznych (np. kwasu octowego, mlekowego) prowadzące do zakwaszenia środowiska. Niskie pH jest czynnikiem hamującym rozwój i rozmnażanie niektórych bakterii patogennych. Innym korzystnym w hamowaniu bakterii patologicznych mechanizmem jest produkcja i wydalanie peptydów lub białek o właściwościach antybiotycznych (bakteriocyny). Istnieje duża różnorodność tego rodzaju produktów. Bakteriocyny mają bardzo różnorodną budowę chemiczną [9]. Kolejnym mechanizmem biochemicznym hamowania wzrostu patogenów jest wydzielanie przez komórki mikrobioty nadtlenu wodoru (H_2O_2) [10] lub siarkowodoru (H_2S) [11], związków wysoce toksycznych dla niektórych bakterii chorobotwórczych. Bakterie mikrobioty mogą również w sposób fizyczny blokować dostęp bakteriom patogennym do powierzchni jelita [12]. Bez możliwości przyczepienia się do powierzchni jelita, bakterie patogenne staną się częścią zawartości jelita, która jest wydalana na zewnątrz. Zróżnicowana i zrównoważona mikrobiota jelitowa jest kluczowym czynnikiem dla oporności organizmu człowieka na kolonizację bakteriami patologicznymi. W przypadku dysbiotycznej mikrobioty jelitowej równowaga pomiędzy bakteriami komensalami a bakteriami patologicznymi jest zaburzona. Dysbiotyczna mikrobiota jelitowa charakteryzuje się zmniejszoną różnorodnością, redukcją niektórych bakterii komensalnych i zwiększoną obecnością bakterii patogennych [13]. Dysbioza może być spowodowana przez wiele czynników, np. zmianę diety czy stosowane środki farmakologiczne. Dysbioza w przebiegu terapii antybiotykami jest jedną z najczęstszych przyczyn dysbiozy indukowanej farmakologicznie [14]. Wszystkie antybiotyki podawane doustnie mają wpływ, chciany lub nie, na bakterie bytujące w jelicie. Jako ogólną zasadę można przyjąć, że po pięciu dniach terapii antybiotykami o szerokim spektrum

działania nastąpi utrata około jednej trzeciej komensalnych bakterii bytujących w przewodzie pokarmowym. To, które bakterie mikrobioty jelitowej zostaną wyeliminowane w trakcie antybiotykoterapii zależy od wrażliwości poszczególnych bakterii jelitowych na dany konkretny antybiotyk. Działanie antybiotyku na bakterie komensalne mikrobioty jelitowej bez wątplenia powoduje zmniejszenie lub utratę oporności na kolonizację bakteriami patologicznymi. W konsekwencji doprowadzić to może do namnażania się bakterii patogennych. Jednak to, czy tak się stanie zależy również od wrażliwości bakterii patogennych na dany antybiotyk. Jeśli dana bakteria patogenna jest wrażliwa na stosowany antybiotyk, antybiotyk ten będzie powstrzymywał również wzrost tego patogenu. Jeśli jednak patogen jest odporny na stosowany antybiotyk, znajdzie on idealne warunki do namnażania się. W takich okolicznościach wzrost patogenu nie będzie ograniczony ani przez oporność na kolonizację, ani przez antybiotyk, co spowoduje niekontrolowane rozprzestrzenianie się patogenu i w konsekwencji wystąpienie objawów chorobowych. W związku z powyższym, antybiotykoterapia pacjentów będących nosicielami antybiotykoopornych bakterii patogennych niesie ze sobą zwiększone ryzyko niekontrolowanego wzrostu tych patogenów. Typowym przykładem tego typu patologii jest rozwój bakterii *Clostridium difficile*.

Mikroorganizmy probiotyczne - historia

Historia probiotyków jest tak stara jak historia ludzkości, ponieważ jest ściśle związana ze stosowaniem żywności fermentowanej, co prawdopodobnie rozpoczęło się około 10 000 lat temu. Współczesna historia probiotyków zaczyna się od prac ukraińskiego naukowca I. Miecznikowa, na początku XX. Miecznikow badał pozytywny wpływ niektórych bakterii na zdrowie człowieka. Już w tej wczesnej fazie prac naukowych o probiotykach proponował on zastąpienie w jelitach człowieka szkodliwych mikrobów pożytecznymi [15]. Niestety, koncepcja Miecznikowa była w dużej mierze ignorowana aż do połowy lat 90 XX wieku, kiedy to zaczęły pojawiać się dowody doświadczalne potwierdzające jej słuszność [16].

Słowo probiotyk pochodzi od łacińskiego "pro" i greckiego "bios", co dosłownie oznacza "dla życia" i zostało wprowadzone przez niemieckiego naukowca W. Kollatha w 1953 roku na oznaczenie "substancji aktywnych, które są niezbędne dla zdrowia" [17]. W roku 1992 R. Fuller zdefiniował probiotyki jako "suplement diety zawierający żywe mikroorganizmy, który korzystnie wpływa na gospodarza poprzez poprawę jego równowagi mikrobiologicznej w obrębie przewodu pokarmowego" [18]. W 2014 roku opublikowano dokument konsensusu

ekspertów dotyczący zakresu i właściwego stosowania terminu probiotyk. Zgodnie z tymi ustaleniami probiotyki to „żywe mikroorganizmy, które podawane w odpowiednich ilościach przynoszą gospodarzowi korzyści zdrowotne" [19]. Mikroorganizmy powszechnie występujące w probiotykach to różnego rodzaju szczepy bakterii lub drożdżaki. Najbardziej popularne mikroorganizmy występujące w komercyjnie dostępnych na rynku produktach probiotyków pochodzą z bakterii rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* oraz drożdżaków *Sacharomyces boulardii*. W zależności od ilości szczepów bakteryjnych zawartych w produkcie można wyróżnić probiotyki jedno- i wieloszczepowe.

Definicja Prebiotyku

Koncepcja modulacji składu mikrobioty jelitowej poprzez podawanie prebiotyków została wprowadzona w 1995 roku przez Gibsona i Roberfroida [20]. Podczas gdy termin probiotyk odnosi się do żywego mikroorganizmu, termin prebiotyk odnosi się do "niestrawnego składnika żywności, który promuje wzrost korzystnych mikroorganizmów w jelitach" [21]. Fruktooligosacharydy (FOS) i galaktooligosacharydy (GOS) to dwie ważne, komercyjnie stosowane grupy prebiotyków o korzystnym wpływie na zdrowie człowieka.

Definicja Synbiotyku

Synbiotykami są natomiast produkty zawierające jeden lub kilka mikroorganizmów probiotycznych połączonych ze składnikiem prebiotycznym łącząc w ten sposób właściwości tych dwóch kategorii substancji [22]. Termin ten związany jest z faktem, że połączenie (często) wyraża silniejsze efekty niż można by się spodziewać po oddzielnym podaniu poszczególnych składników.

Kryteria doboru najskuteczniejszego preparatu rynkowego probiotyku w leczeniu kolki niemowlęcej

W świetle przedstawionych powyżej faktów i z uwagi na rosnącą częstość stosowania mikroorganizmów probiotycznych w codziennej praktyce lekarskiej moja działalność naukowa skupiła się na wyżej wymienionych zagadnieniach. Pracując na co dzień jako lekarz rodzinny mam do czynienia zarówno z pacjentami dorosłymi jak i dziećmi wymagającymi terapii preparatami zawierającymi probiotyki.

W mojej pracy naukowej prowadzonej w ostatnich latach określiłam najważniejsze kryteria doboru najefektywniejszych preparatów rynkowych zawierający mikroorganizmy probiotyczne. Badania te zostały przeprowadzone w warunkach „in vitro” i opublikowane w dwóch artykułach naukowych.

- 1. Malgorzata Bernatek, Wioletta Żukiewicz-Sobczak, Sabina Lachowicz-Wiśniewska and Jacek Piątek “Factors Determining Effective Probiotic Activity: Evaluation of Survival and Antibacterial Activity of Selected Probiotic Products Using an “In Vitro” Study” Nutrients 2022, 14(16), 3323; <https://doi.org/10.3390/nu14163323> - 13 Aug 2022
IF – 6,706,
MNiSW: 140.00**

Na rynku możemy znaleźć olbrzymią ilość preparatów zawierających mikroorganizmy probiotyczne. Są to zarówno leki jak suplementy diety oraz żywność specjalnego przeznaczenia tzw. żywność funkcjonalna. Nie wszystkie one są w równym stopniu efektywne. Wiele preparatów probiotyków nie zawiera w opakowaniu deklarowanej ilości szczepów probiotycznych lub szczepy te nie są do końca sklasyfikowane czy przebadane. Mimo rosnącej świadomości stosowania probiotyków, również wśród lekarzy i farmaceutów, nadal w wielu sytuacjach o wyborze probiotyku decydują: cena, wielkość opakowania czy reklama. Niewielka część pacjentów wybiera probiotyk analizując funkcje i działanie określonego szczepu bakterii, ilość szczepów bakteryjnych w kapsułce czy technologię farmaceutyczną stosowaną przez producenta. Trzeba sobie zdawać sprawę, że są to zasadnicze czynniki warunkujące optymalne działanie danego produktu rynkowego probiotyku. Warunki środowiskowe panujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego ograniczają ilość żywych bakterii docierających do miejsca ich działania.

Ważnym czynnikiem warunkującym optymalną przeżywalność bakterii probiotycznych jest sposób ich produkcji, co determinuje ilość żywych bakterii docierających do jelita i jego kolonizację. Zasadnicze znaczenie dla prawidłowej kolonizacji jelita przez probiotyki ma ich pasaż przez ekstremalnie niekorzystne dla żywych bakterii kwaśne środowisko żołądka. Po doustnym przyjęciu preparatu probiotyku dostaje się on do żołądka gdzie narażony jest na działanie kwasu solnego zawartego w soku żołądkowym. W przypadku probiotyków działanie kwasu solnego na mikroorganizmy znajdujące się w nich jest oczywiście zjawiskiem niekorzystnym zmniejszającym ich przeżywalność. W celu ochrony szczepów bakteryjnych

znajdujących się w preparatach probiotyków wprowadzono różnego rodzaju technologie ochrony. Technologie te sprowadzają się do ochrony znajdujących się w tych preparatach szczepów bakteryjnych przed destrukcyjnym działaniem zarówno kwasu solnego jak i innych czynników trawiennych. Coraz częściej pojawiają się formy probiotyków zamknięte w kapsułkach olejowych lub dojelitowych, które mają ochronić pałeczki *Lactobacillus* czy *Bifidobacterium* przed niekorzystnym działaniem enzymów i niskim pH. Ważną cechą mikroorganizmów probiotycznych, jest również ich odporność na warunki panujące w dalszych częściach przewodu pokarmowego, a zwłaszcza tolerancja i wzrost w obecności soli kwasów żółciowych. Bakterie probiotyczne wykorzystują kilka mechanizmów obrony przed działaniem żółci, w tym specjalne mechanizmy transportowe, syntezę różnego rodzaju białek powierzchniowych i kwasów tłuszczowych lub produkcję egzopolisacharydów. Zdolność do enzymatycznej hydrolizy soli żółciowych występuje u wielu bakterii. Hydrolaza choloiloglicynowa, jest konstytutywnym enzymem wewnątrzkomórkowym odpowiedzialnym za hydrolizę wiązania amidowego pomiędzy glicyną lub tauryną a jądrem steroidowym kwasów żółciowych. Jego obecność wykazano w specyficznych mikroorganizmach z kilku rodzajów bakterii (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*).

Aktywność hydrolazy soli żółciowych może stwarzać możliwość wykorzystania uwolnionych aminokwasów przez bakterie jako źródła węgla i azotu, ułatwiać detoksykację żółci lub wspomagać wbudowywanie cholesterolu w ścianę komórkową. Dekoniugacja soli żółciowych może być bezpośrednio związana z obniżeniem stężenia cholesterolu w surowicy, z którego sprzężone sole żółciowe są syntetyzowane *de novo*. Udokumentowano również zdolność mikroorganizmów do asymilacji lub wiązania połączanego cholesterolu ze ścianą komórkową albo do jego eliminacji poprzez współstrącanie z uwolnionym kwasem cholowym. Niektóre bakterie mikroflory jelitowej wytwarzają reduktazę cholesterolową, która katalizuje przemianę cholesterolu do nierozpuszczalnego koprostanolu, który jest następnie wydalany z kałem, co również zmniejsza ilość cholesterolu egzogenego. Jak widać istnieje duża różnorodność mechanizmów obronnych mikroorganizmów probiotycznych w stosunku do żółci. Wydaje się, więc oczywiste, że preparaty probiotyków obecne na naszym rynku należałoby poddać badaniom oporności na kwas solny (imitacja warunków panujących w żołądku), oraz żółć, ponieważ dopiero po pasażu przez żołądek i dwunastnicę docierają one do właściwego miejsca ich działania. Kolejnym bardzo istotnym kryterium doboru właściwego probiotyku jest ich antagonistyczne działanie biologiczne w stosunku do bakterii

patologicznych. Jednym z prostych badań pozwalających na określenie przewidywanego efektu terapeutycznego jest badanie stref hamowania probiotyków stosunku do bakterii patologicznych. Do zaburzeń flory bakteryjnej może dojść w wyniku infekcji patologicznymi bakteriami takimi jak *Salmonell*, *Shigella* czy *Escherichia coli*. Ponadto z zaburzeniami zarówno ilościowymi jak jakościowymi mikroflory jelitowej możemy mieć do czynienia w trakcie antybiotykoterapii. Dotyczy to zwłaszcza chorych u których w sposób przewlekły stosuje się duże dawki antybiotyków. W tych przypadkach mamy najczęściej do czynienia z nadkażeniem bakteriami *Clostridium difficile*.

Badania przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych przeprowadziłam w trzech etapach. W przeprowadzonych badaniach stworzyłam model eksperymentu naśladujący „in-vitro” warunki kwasowe panujące w świetle żołądka oraz w obecności soli kwasów żółciowych odpowiadającym ich stężeniu w soku dwunastniczym. W warunkach tych w pierwszym etapie badań określiłam czas po którym następuje dezintegracja kapsułek zawierających różne rynkowe preparaty probiotyków. W tym celu kapsułki preparatów rynkowych umieszczano w roztworze kwasu solnego i rejestrowano czas po którym dochodziło do rozpadu ścianki kapsułki i uwolnienia jej zawartości.

W drugim etapie badań kapsułki o znanej ilości mikroorganizmów probiotycznych umieszczano i inkubowano w roztworze HCl przez 90 minut. Po tym czasie określano ilość żywych mikroorganizmów znajdujących się w roztworze.

W trzecim etapie badań mikroorganizmy zawarte w jednej kapsułce preparatu rynkowego inkubowano przez 180 minut w 0,4-procentowym roztworze żółci i określono ilość żywych mikroorganizmów po inkubacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłam, iż przeżywalność mikroorganizmów zawartych w preparatach rynkowych probiotyków uzależniona jest przede wszystkim od rodzaju użytej w produkcji kapsułki i czasu jej dezintegracji. Szybka dezintegracja kapsułki i niska przeżywalność zawartych w niej mikroorganizmów przyczynia się do słabszej kolonizacji jelita i mniejszej efektywności ich działania. W pracy tej oceniłam również zdolności hamowania rozwoju patogenów przewodu pokarmowego przez drobnoustroje zawarte w pięciu preparatach probiotyków dostępnych na rynku. Do badań użyłam czterech najczęściej spotykanych patogenów przewodu pokarmowego człowieka.

1. *Escherichia coli*

2. *Shigella*
3. *Salmonella spp*
4. *Clostridium difficile*

Antagonizm między mikroorganizmami probiotycznymi a bakteriami patologicznymi oznaczyłam metodą bargrafu wg Strusa.

Wyniki moich badań wykazały, iż zdolność hamowania bakterii patologicznych uzależniona jest od różnorodności szczepów bakteryjnych zawartych w rynkowych preparatach probiotyków. Im większa jest różnorodność szczepów bakteryjnym w danym preparacie probiotyku tym jego zdolność hamowania bakterii patologicznych w warunkach „in-vitro” jest większa.

Największa strefa hamowania w stosunku do bakterii patologicznych występowała w posiewach zawierających produkt wytwarzany w kapsułkach opornych na sok żołądkowy, zawierający 9 różnych szczepów bakteryjnych. W przypadku tego preparatu mamy do czynienia z największymi strefami hamowania w stosunku do wszystkich czterech badanych bakterii patologicznych (*Salmonella spp. Escherichia coli, Clostridium difficile* oraz *Shigella spp*). Z najmniejszymi strefami hamowania mamy natomiast do czynienia w przypadku preparatów probiotyków zawierających tylko jeden szczep bakterii probiotycznych i produkowanych w tradycyjnej technologii. W tym przypadku dotyczyło to także wszystkich czterech rodzajów bakterii patologicznych. Pośrednie wielkości stref hamowania występowały w przypadku pozostałych produktach probiotyków.

2. Bernatek Małgorzata, Henning Sommermeyer, Andrzej Wojtyła, Sabina Lachowicz-Wiśniewska, Jacek Piątek, MD, “The factors determining effective probiotic activity - evaluation of survival and antibacterial activity of selected probiotic products: an "in-vitro" study”. J Health Inequal 2023; 9 (2): DOI: <https://doi.org/10.5114/jhi.2023.130528>

Celem mojego kolejnego badania była ocena oporności na stres osmotyczny oraz przeżywalność mikroorganizmów zawartych w różnych preparatach rynkowych probiotyków pediatrycznych podczas inkubacji w kwasie solnym. Aby probiotyki działały efektywnie

niezbędna jest kolonizacja przez mikroorganizmy jelita gospodarza. Warunki środowiskowe panujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego warunkują ilość żywych, korzystnych dla naszego organizmu mikroorganizmów docierających do miejsca ich działania. Jest to jednocześnie mechanizm ochronny w stosunku do bakterii patologicznych. Niskie pH żołądka przyczynia się do częściowego wyjąłwienia pokarmu dostającego się do dalszych części przewodu pokarmowego. Jedną z technologii służącą do ochrony żywych mikroorganizmów znajdujących się w produktach rynkowych probiotyków jest mikrokapsułkowanie.

Microkapsułkowanie służy do wzmacniania oporności, zwiększa stabilność i przeżywalność szczepów bakterii probiotycznych dzięki ochronie przed niekorzystnymi czynnikami fizykochemicznymi takimi jak: wysoka temperatura, tlen, ciśnienie osmotyczne, wilgotność względna, enzymy przewodu pokarmowego i wreszcie niskie pH panujące w żołądku.

Zaplanowane przez nas badania wykazać miały na ile technologia mikrokapsułkowania jest efektywna w przypadku preparatów probiotycznych stosowanych w pediatrii. pH żołądka dorosłego człowieka wynosi około 1.2. Wartość ta stabilizuje się w wieku około 3 lat. U dzieci młodszych pH jest wyższe. Po ukończeniu pierwszego roku życia pH soku żołądkowego dziecka wynosi około 3. Preparaty probiotyczne stosowane w pediatrii zawierają zarówno pojedyncze szczepy bakteryjne jak i ich mieszanki. Preparaty te poza różnicami jakościowymi różnią się również ilością żywych mikroorganizmów w nich zawartych. Do tego dodać należy zastosowanie w ich produkcji różnych technologii. W praktyce lekarskiej stajemy przed pytaniem jakie preparaty probiotyków są najbardziej efektywne biologicznie. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa naukowego należy stwierdzić, iż jednymi z najważniejszych kryteriów przydatności terapeutycznej preparatów farmaceutycznych zawierających żywe mikroorganizmy jest ich przeżywalność w niskim pH imitującym środowisko żołądka oraz oporność na stres osmotyczny. Wydaje się więc oczywiste, że preparaty probiotyków stosowanych w pediatrii obecne na naszym rynku należy poddać badaniom określającym ich przydatność terapeutyczną. W badaniach naszych uwzględniliśmy fizjologiczne odrębności przewodu pokarmowego niemowląt i dzieci (inne wartości pH soku żołądkowego w porównaniu z dorosłymi). W drugiej części badań określiliśmy odporność mikroorganizmów zawartych w różnych preparatach rynkowych na stres osmotyczny. Parametr ten jest wykładnikiem świadczącym o przeżywalności bakterii w trakcie transportu czy przechowywania.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdziliśmy, iż największa redukcja ilości żywych mikroorganizmów w badanych preparatach rynkowych probiotyków miała miejsce w przypadku ich inkubacji w roztworze kwasu solnego o pH 1.2. Warunki te odpowiadają kwasowości żołądka dorosłego człowieka lub dziecka powyżej trzeciego roku życia. Wzrost pH stosowanego do inkubacji kwasu solnego powoduje zmniejszenie redukcji żywych mikroorganizmów w roztworze a co za tym idzie wzrost współczynnika przeżywalności bakterii probiotycznych badanych preparatów rynkowych probiotyków. Podobne wartości redukcji liczby żywych mikroorganizmów odnotowano w przypadku stresu osmotycznego wywołanego inkubacją bakterii w stężonym roztworze NaCl. Na szczególną uwagę zasługuje fakt znacznych różnic w redukcji ilości żywych bakterii a więc i ich przeżywalności w przypadku preparatów produkowanych w technologii tradycyjnej w porównaniu z preparatami w których mikroorganizmy poddano mikroksułowaniu.

W przypadku produktów rynkowych zawierających w swym składzie taką samą ilość szczepów bakterii probiotycznych ale produkowanych w różnych technologiach współczynnik przeżywalności był wyraźnie wyższy w przypadku zastosowania technologii mikroksulacji. Wyniki naszych badań wykazały również, iż najmniejszą przeżywalnością a co za tym idzie i największą redukcją żywych bakterii mamy do czynienia w przypadku inkubacji preparatu rynkowego zawierającego tylko jeden szczep bakteryjny i produkowanego w technologii tradycyjnej bez mikroksulowania. Zdecydowanie najlepsze wyniki współczynnika przeżywalności i najmniejszą redukcją żywych mikroorganizmów stwierdziliśmy w preparacie wieloszczepowym produkowanym w technologii mikroksulowania. W badaniach naszych odnotowaliśmy również różnice pomiędzy współczynnikiem przeżywalności w preparatach produkowanych w takiej samej technologii - mikroksulowania. W tym przypadku najmniejszą redukcją żywych bakterii oraz najwyższą przeżywalność stwierdziliśmy w preparacie zawierającym największą różnorodność szczepów bakteryjnych. Tendencja do redukcji żywych mikroorganizmów dotyczy zarówno ich inkubacji w kwasie solnym jak i w warunkach stresu osmotycznego wywołanego inkubacją w 4% roztworze NaCl. Otrzymane przez nas wyniki badań pozwoliły stwierdzić, iż technologia mikroksulowania zastosowana w produkcji niektórych preparatów probiotyków jest efektywna w ochronie probiotyków przed destrukcyjnym działaniem kwasu solnego znajdującego się w żołądku. Metoda ta jest również efektywna w przypadku ochrony mikroorganizmów przed destrukcyjnym wpływem stresu wywołanego inkubacją w stężonym roztworze NaCl. W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazaliśmy również, że

przeżywalność mikroorganizmów w warunkach symulujących sok żołądkowy i warunkach stresu w trakcie inkubacji w stężonym roztworze NaCl zależna jest również od różnorodności bakterii zawartych w preparatach rynkowych. Mechanizmy molekularne prowadzące do zwiększonej oporności probiotyków zawierających różne szczepy bakteryjne na kwas solny i stres wymagają dalszych badań.

Druga część mojego osiągnięcia naukowego obejmuje badanie kliniczne efektywności stosowania probiotyków w kolce jelitowej niemowląt oraz ocenę roli kalprotektyny we wspomaganii diagnostyki tego schorzenia.

Badania te wraz z zespołem współpracowników pod moim kierownictwem przeprowadziłam w latach 2021-2022 a ich wyniki przedstawiłam w trzech publikacjach.

Kolka niemowlęca charakteryzuje się nawracającymi i przedłużającymi się okresami płaczu niemowlęcia, marudzenia lub drażliwości, które występują bez wyraźnej przyczyny i którym opiekunowie nie mogą zapobiec ani ich rozwiązać. Diagnoza kolki niemowlęcej oparta jest najczęściej na tzw. kryteriach Wessela ("reguła trzech"), zdefiniowanych przez płacz i niepokój przez ponad trzy godziny dziennie przez ponad trzy dni w tygodniu i przez ponad trzy tygodnie. W większości przypadków kolka niemowlęca jest stanem samoograniczającym się, który ustępuje trzy do pięciu miesięcy po urodzeniu. Częstość występowania kolki niemowlęcej w piśmiennictwie naukowym ocenia się na 3 do 40%. Te duże rozbieżności występowania kolki niemowlęcej zależą od stosowanych kryteriów diagnostycznych. Pomimo łagodnego charakteru, kolka niemowlęca stanowi duże obciążenie dla noworodków, ich rodziców i personelu medycznego, stając się główną przyczyną konsultacji z lekarzem we wczesnym okresie niemowlęcym. Dodatkowo kolka niemowlęca może korelować z depresją matki i prowadzi do wczesnego zakończeniem karmienia piersią. Kolka niemowlęca uznana została również za najsilniejszy czynnik ryzyka wystąpienia urazu głowy (abusive head trauma - AHT), w tym zespołu dziecka potrząsanego (shaken baby syndrome - SBS).

Etiologia kolki niemowlęcej pozostaje niejasna. Kluczową rolę w jej powstawaniu odgrywać może zaburzona mikrobiota jelitowa. Mikrobiota jelitowa niemowląt z kolką wykazuje wolniejszą kolonizację bakteryjną, mniejszą różnorodność mikroorganizmów oraz jej mniejszą stabilność. Ponieważ przyczyna kolki niemowlęcej pozostaje niejasna, jej leczenie obejmuje różne podejścia, między innymi terapię manualną, podawanie probiotyków czy

simetikonu. W opublikowanych ostatnio pracach poglądowych znaleziono dowody, że probiotyki były skuteczne w zmniejszaniu czasu płaczu u niemowląt z kolka jelitową. Dowody na istotny wpływ terapii manualnej czy simetikonu na przebieg kolki niemowlęcej w dostępnym piśmiennictwie naukowym są wątpliwe. Najlepiej scharakteryzowanym probiotykiem w leczeniu kolki niemowlęcej jest *Limosilactobacillus (L.) reuteri DSM17938*, jednak skrócenie czasu trwania płaczu pod wpływem tego probiotyku obserwowano głównie u niemowląt karmionych wyłącznie piersią. Nie stwierdzono natomiast wpływu preparatów probiotycznych zawierających *L. rhamnosus GG* na czas trwania płaczu niemowląt w przebiegu kolki jelitowej. Wśród nielicznych badań oceniających wpływ synbiotyków wieloszczepowych w kolce niemowlęcej, w dwóch przypadkach wykazano istotne skrócenie czasu trwania płaczu niemowląt w czasie stosowania tego typu terapii.

Simethicone (Simetikon), mieszanina dimetikonu i SiO_2 , jest dość starym produktem, który jak się twierdzi, działa jako miejscowa bariera chroniąca błonę śluzową jelit przed czynnikami drażniącymi. Nie wchłania się i jest praktycznie nietoksyczny. O ile jego zastosowanie w procedurach diagnostycznych jest dobrze ugruntowane, o tyle efekty terapeutyczne w wielu wskazaniach gastroenterologicznych są sprzeczne.

Opublikowano kilka mniejszych badań dotyczących zastosowania simetikonu w kolce niemowlęcej, ale dowody efektywności jego działania nie osiągnęły progu istotności. Pomimo braku dowodów na korzystne działanie, simetikon jest w niektórych krajach, w tym w Polsce szeroko stosowany w leczeniu kolki niemowlęcej.

Kalprotektyna jest białkiem wiążącym wapń i cynk, które występuje głównie w obrębie neutrofilów. Obecność kalprotektyny w kale jest konsekwencją migracji neutrofilów do tkanki przewodu pokarmowego w wyniku procesów zapalnych. Po związaniu z wapniem kalprotektyna wykazuje dużą odporność termiczną i jest stabilna w próbkach kału przez dłuższy czas nawet w temperaturze pokojowej. Stężenie kalprotektyny w kale wykazuje dobrą korelację z stanem zapalnym w obrębie jelit i jest powszechnie stosowane jako biomarker tego typu zaburzeń. W badaniach z ostatnich lat wykazano, że poziom tego markera zapalenia jelit podwyższony jest u dzieci z kolką w porównaniu z grupą dzieci zdrowych. Ponieważ zaburzona mikrobiota jelitowa koreluje również z zapaleniem jelit, sugerowano, że procesy zapalne w jelitach mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie kolki niemowlęcej. Podawanie probiotyku *L. reuteri DSM17938* powodowało w tych przypadkach obniżenie poziomu kalprotektyny kałowej.

Celem pierwszej fazy próby klinicznej było:

- porównanie skuteczności działania probiotyku zawierającego 9 szczepów bakteryjnych produkowanych w technologii mikrokapsulacji z symetikonem u dzieci z kolką niemowlęcą.

3. Piątek Jacek, Bernatek Małgorzata, Krauss Hanna, Wojciechowska Małgorzata, Chęcińska-Maciejewska Zuzanna, Kaczmarek Przemysław, Sommermeyer Henning.
“Effects of a nine-strain bacterial synbiotic compared to simethicone in colicky babies: an open-label randomised study” Beneficial Microbes 2021, 12 (3), 249-257
<https://doi.org/10.3920/BM2020.0160>
Impact Factor: 5.050
Punktacja MEiN: 70.000

Badanie nasze przeprowadziliśmy od kwietnia do lipca 2020 roku.

Badanie zarejestrowane zostało w serwisie ClinicalTrials.gov (NCT04487834) i przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską w Przychodni Lekarzy Rodzinnych. Protokół badania został zaaprobowany przez Komisję Etyczną Akademii Kaliskiej w Kaliszu, Polska (kod identyfikacyjny projektu 1/2020).

W okresie rekrutacji do badania w Poradni Lekarza Rodzinnego urodziło się łącznie 915 dzieci. Rodzice 211 dzieci wyrazili zgodę na ocenę ich niemowląt pod kątem możliwości udziału w badaniu. Spośród badanych niemowląt 87 (41,2%) spełniało kryteria Wessel'a stosowane przy włączaniu do grupy badanej. Jedno dziecko spełniało kryteria Wessela, ale zostało wykluczone z powodu wcześniejszej antybiotykoterapii. 123 noworodki zostały wykluczone z powodu niespełnienia kryteriów Wessela. Spośród dzieci ze zdiagnozowaną kolką niemowlęcą 33 leczonych było simetykonem, a 54 synbiotykiem wieloszczepowym. Żaden pacjent nie został wykluczony podczas pozostałej fazy badania. Analiza statystyczna wykazała, że w czasie rozpoczynania próby klinicznej nie było istotnych różnic między obiema grupami niemowląt.

Trzy główne analizowane parametry badania to: (i) liczba dni płaczu w ciągu ostatnich trzech tygodni, (ii) średni czas trwania wieczornego płaczu w ciągu ostatnich trzech tygodni oraz (iii) średnia liczba faz płaczu w ciągu dnia w ciągu ostatnich trzech tygodni. Zarówno w grupie niemowląt otrzymujących simetikon jak i wieloszczepowy synbiotyki zaobserwowano znaczne zmniejszenie zarówno liczby dni płaczu w ciągu ostatnich trzech tygodni, jak i średniego czasu trwania płaczu wieczornego. Porównanie efektów działania synbiotyku wieloszczepowego z efektem działania simetikonu wykazało, że synbiotyki wieloszczepowe miały istotnie ($p \leq 0,0001$) lepszy wpływ na główne, badane parametry. Średnia liczba faz płaczu w ciągu ostatnich trzech tygodni została znacząco zredukowana przez synbiotyki wieloszczepowe natomiast efektu tego nie zaobserwowano w grupie niemowląt otrzymujących simetikon.

Obniżenie parametrów określających nasilenie kolki (liczba dni płaczu w ciągu ostatnich trzech tygodni i średni czas trwania płaczu wieczornego) było znacznie wyższe w grupie niemowląt otrzymujących synbiotyki wieloszczepowe w porównaniu do grupy otrzymującej simetikon. Średnia liczba faz płaczu w ciągu badania nie wykazała istotnej statystycznie różnicy między grupą leczoną simetikonem a grupą leczoną synbiotykiem wieloszczepowym.

Oprócz głównych badanych parametrów, w badaniu oceniono szereg innych objawów towarzyszących kolce niemowlęcej. W analizie statystycznej efektów synbiotyku wieloszczepowego i simetikonu, zastosowano test Cochran-Armitage'a Chi-kwadrat. Testowano trend liniowy danych uporządkowanych według skuteczności leczenia. Uzyskane wyniki uporządkowane zostały w trzech grupach: Przed leczeniem ($n=87$), simetikon ($n=33$) i synbiotyki wieloszczepowe ($n=54$). Wyniki naszych badań potwierdziły istotną statystycznie, większą skuteczność synbiotyku wieloszczepowego dla: (i) zmniejszenia liczby niemowląt, których nie można uspokoić podczas płaczu, (ii) zmniejszenia liczby niemowląt z problemami z zasypianiem, (iii) zmniejszenia liczby niemowląt ze wzdętym brzuchem oraz (iv) zmniejszenia liczby niemowląt z cofającymi się nóżkami. Ani podawanie simetikonu, ani synbiotyku wieloszczepowego nie miało wpływu na objaw zaczerwienia twarzy u badanych niemowląt.

Ograniczeniem naszego badania była konieczność wykorzystania dzienników rodzicielskich do pomiaru zachowań niemowląt. Ich używanie nie jest pozbawione problemów. Z piśmiennictwa naukowego wiemy, że zapisy w papierowych dziennikach zachowań niemowląt mogą dostarczyć dość dobrych szacunków jeśli chodzi o czas trwania

ale częstotliwość zachowań niemowląt może być niedoszacowana. Innym istotnym ograniczeniem naszego badania jest również fakt, że nie zastosowano ślepej próby podawania leków. Wcześniejsze doświadczenie lub brak doświadczenia z jednym z badanych leków może zatem wpływać na otrzymane przez nas wyniki. Jednakże w przypadku części pacjentów mogło to wpłynąć negatywnie (np. preferowanie preparatu płynnego nad proszkowym), podczas gdy u innych mogło mieć wpływ pozytywny, co przynajmniej w pewnym stopniu mogło zniwelować te efekty.

Choć można kwestionować konieczność farmakologicznego leczenia kolki niemowlęcej, to presja rodziców na pediatrów, by przepisywali leki, jest olbrzymia. Wyniki naszego badania mogą pomóc pediatrom w podejmowaniu decyzji o wdrożeniu leczenia farmakologicznego kolki niemowlęcej.

Celem drugiej fazy badania klinicznego było:

- określenie wpływu dziewięcioszczepowego synbiotyku i symetikonu na czas trwania płaczu oraz stężenie markera stanu zapalnego jelit jakim jest kalprotektyna u dzieci z kolką niemowlęcą w wieku 3-6 tygodni, zdiagnozowaną na podstawie kryteriów Wessela.

4. Bernatek Małgorzata, Piątek Jacek, Pszczola Marcin, Krauss Hanna, Antczak Janina, Maciukajć Paweł, Sommermeyer Henning. „Nine-strain bacterial synbiotic improves crying and lowers fecal calprotectin in colicky babies : an open-label randomized study”
Microorganisms 2022, 10 (2) (430) ; [9 s.] DOI: 10.3390/microorganisms10020430

Impact Factor: 4.926

Punktacja MEiN: 40.000

Badanie zarejestrowane zostało w serwisie ClinicalTrials.gov (NCT04666324) i przeprowadzone od grudnia 2020 do września 2021 zgodnie z Deklaracją Helsińską w Przychodni Lekarzy Rodzinnych. Protokół badania został zaaprobowany przez Komisję Bioetyczną Akademii Kaliskiej w Kaliszu, Polska (kod identyfikacyjny projektu 2/2020).

Rozpoznanie kolki niemowlęcej na podstawie kryteriów Wessela wykonywane było w ramach standardowego zestawu badań u wszystkich noworodków (w wieku 3-6 tygodni) w dwu ośrodkach. Dzieci, których rodzice wyrazili zgodę na udział w badaniu, poddano ocenie kwalifikującej do udziału w badaniu. Kryteriami wykluczającymi było wcześniejsze leczenie probiotykami, synbiotykami lub antybiotykami oraz organiczne przyczyny płaczu.

Niemowlęta bez kolki zostały przydzielone do grupy kontrolnej (n=20) w celu pomiaru poziomu kalprotektyny w dniu zapisania (dzień 1) i po czterech tygodniach (dzień 28). Dzieci z kolką jelitową zostały w równym stopniu randomizowane i przydzielone albo do grupy leczonej simetykonem (n=50) albo do grupy leczonej synbiotykiem wieloszczepowym

(n=50). Wymagane wielkości badanych grup ustalono przy użyciu kalkulatora wielkości próbek firmy Sealed Envelope Ltd. (Londyn, Wielka Brytania), przy założeniu poziomu istotności 5%, mocy 80%, wskaźnika odpowiedzi 50% w grupie otrzymującej simetikon i 80% w grupie otrzymującej synbiotyki wieloszczepowy oraz wskaźnika rezygnacji 0%. Schemat randomizacji z równym przydziałem do dwóch grup terapii został wygenerowany przy użyciu programu Simple Randomiser firmy Sealed Envelope Ltd. (Londyn, Wielka Brytania). Produkt został przydzielony pacjentom przez pediatrów przy użyciu schematu randomizacji na podstawie wejścia do badania. Jedna grupa niemowląt leczona była przez cztery tygodnie simethicone (Espumisan®, 100 mg/ml, Berlin Chemie/Menarini Polska sp. z o.o., Warszawa, Polska). Espumisan podawano 3 - 6 razy dziennie, przy czym każda kuracja obejmowała 6 kropli roztworu 100 mg/ml. Niemowlętom drugiej grupy podawano jedno opakowanie sztyftowe synbiotyku wieloszczepowego dziennie. Każde opakowanie sztyftowe synbiotyku wieloszczepowego zawiera łącznie 10^9 jednostek tworzących kolonie (CFU) z równymi ilościami CFU następujących bakterii probiotycznych: *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lacti-caseibacillus casei* R0215; *Lacticaseibacillus paracasei* Lpc-37; *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115; *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, *Ligilactobacillus salivarius* Ls-33, *Bifidobacterium (B.) lactis* Bl-04, *B. bifidum* R0071, *B. longum* R0175 oraz 1,43 g prebiotyku - fruktooligosacharydów (FOS). Rodzice otrzymali dzienniczek (24-godzinny Parental Daily Report), w którym zapisywali zachowania związane z płaczem, podawanie leków i działania niepożądane w ciągu 28 dni badania.

W okresie rekrutacji do badania w dwóch ośrodkach badawczych urodziło się łącznie 1248 dzieci. 1 122 (89,9%) oceniono pod kątem spełnienia kryteriów Wessela dla kolki niemowlęcej. 242 (21,6%) noworodki zakwalifikowano jako dzieci z kolką. Spośród nich 117 zostało wykluczonych, ponieważ rodzice odmówili udziału w badaniu, a 25 ponieważ niemowlęta spełniały jedno lub kilka kryteriów wykluczenia. Pozostałe 100 noworodków przydzielono w równym stopniu do grupy leczonej simetikonem lub grupy leczonej synbiotykiem wieloszczepowym 20 noworodków z 880 zdrowych zostało zrekrutowanych do grupy kontrolnej badania w celu pomiaru kalprotektyny kałowej za zgodą rodziców. Dwóch pacjentów z grup leczonej zostało wykluczonych z końcowych analiz z powodu naruszenia

protokołu (błędny przydział leczenia), a pięciu pacjentów zostało wykluczonych, ponieważ otrzymali antybiotyki w okresie leczenia.

W wynikach naszych badań stwierdziliśmy, iż w obu grupach leczonych niemowląt czas trwania dziennego płaczu stopniowo zmniejszał się w trakcie trwania badania. Analiza regresji liniowej wykazała, że w grupie leczonej simetikonem czas trwania płaczu zmniejszał się o -5,74 min na dzień leczenia, natomiast leczenie synbiotykiem wieloszczepowym powodowało redukcję o -7,18 min na dzień. Różnica między grupami wynosiła -1,44 min/dzień, co uznano za różnicę wysoce istotną.

W obu grupach pacjentów nie odnotowano żadnych działań niepożądanych stosowanych leków.

Stężenie kalprotektyny w kale u niemowląt bez kolki (grupa kontrolna) był podobny w 1 i w 28 dniu badania. U dzieci z kolką niemowlęcą poziom kalprotektyny w 1 dniu był znacząco wyższy, zarówno w grupie otrzymującej simetikon, jak i w grupie otrzymującej synbiotyki wieloszczepowy, w porównaniu z poziomem u dzieci zdrowych. Nie było również istotnej różnicy pomiędzy poziomem kalprotektyny w kale niemowląt otrzymujących simetikon w porównaniu do grupy otrzymującej synbiotyki. W 28 dniu badania poziom kalprotektyny w kale w grupie simetikonu był nieznacznie niższy w porównaniu z pierwszym dniem badania. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy znacznie większy spadek poziomu kalprotektyny w kale w grupie niemowląt otrzymujących synbiotyki. Poziom kalprotektyny w grupie stosującej synbiotyki wieloszczepowy w 28 dniu badania był nadal znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej w tym samym czasie.

Wyniki naszego badania wskazują, że synbiotyki wieloszczepowy może być rozważany jako opcja leczenia mająca na celu skrócenie czasu trwania płaczu u dzieci z kolką, co może być związane z efektem przeciwzapalnym u tych pacjentów. Natomiast podanie simetikonu spowodowało mniejsze skrócenie czasu trwania płaczu i nie miało wpływu na stężenie kalprotektyny w kale badanych dzieci. Uzyskane przeze mnie wyniki badań sugerują również, że pomiar kalprotektyny w kale może być wykorzystany zarówno do wspomagania diagnostyki kolki niemowlęcej, jak i do monitorowania efektów leczenia. Ponieważ nawet po czterech tygodniach leczenia synbiotykiem wieloszczepowym poziom kalprotektyny w kale był nadal istotnie wyższy niż u dzieci bez kolki, w przyszłych badaniach należy rozważyć dłuższy czas podawania leków.

Na podstawie uzyskanych wyników próby klinicznej przygotowaliśmy również publikację omawiającą możliwość wspomagania diagnostyki kolik u niemowląt przez zastosowanie badania stężenia Kalprotektyny w próbkach stolca niemowląt.

5. Sommermeyer Henning, Bernatek Małgorzata, Pszczola Marcin, Krauss Hanna, Piątek Jacek. “Supporting the diagnosis of infantile colic by a point of care measurement of fecal calprotectin” *Frontiers in Pediatric* 2022, 10 (978545) DOI: 10.3389/fped.2022.978545

Impact Factor: 3.569

Punktacja MEiN: 70.000

Przedstawione poniżej dane zostały uzyskane w ramach badania, które zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną ds. badań z udziałem ludzi Akademii Kaliskiej Polska (kod identyfikacyjny projektu 2/2020, zatwierdzony 20.10.2020) i które zostało zarejestrowane w serwisie ClinicalTrials.gov (NCT04666324). Od rodziców niemowląt biorących udział w badaniu uzyskano pisemną świadomą zgodę.

Niemowlęta z kolką niemowlęcą wykazują przedłużony czas trwania nieutulonego płaczu lub marudzenia bez wyraźnej przyczyny organicznej. Jest to łagodny stan, który pojawia się, gdy niemowlę ma około sześciu tygodni i w większości przypadków ustępuje do trzeciego do szóstego miesiąca życia. Kolka niemowlęca powoduje znaczny stres dla rodziców i została uznana za czynnik ryzyka dla depresji matki, przedwczesnego zakończenia karmienia piersią oraz zespołu dziecka potrząsanego. W 1954 roku Wessel i wsp. zdefiniowali kolkę u niemowląt jako płacz lub marudzenie przez ponad trzy godziny dziennie, przez ponad trzy dni w tygodniu, przez ponad trzy tygodnie (reguła trzech Wesselów). Prośzenie rodziców o czekanie przez trzy tygodnie do momentu, w którym możliwe jest ustalenie rozpoznania, uznano za niepraktyczne, co zaowocowało opracowaniem zestawu zmodyfikowanych kryteriów Wessela, w których czas trwania objawów skrócono do jednego tygodnia. Ponieważ reguła trzech Wesselów i zmodyfikowane kryteria Wesselów nie uwzględniły łagodnego charakteru kolki niemowlęcej, szybko uznano, że należy ją zaklasyfikować jako zaburzenie czynnościowe przewodu pokarmowego (functional gastrointestinal disorder - FGID) według rzymskich kryteriów diagnostycznych (kryteria Rzym III). FGID obejmuje przewlekłe lub nawracające objawy, które występują przy braku jakichkolwiek

nieprawidłowości anatomicznych, zapalenia lub uszkodzenia tkanek. Kryteria rzymskie III dla kolki niemowlęcej dotyczą noworodków od urodzenia do 4 miesiąca życia i muszą obejmować okresy drażliwości, marudzenia/płaczu, które zaczynają się i kończą bez wyraźnej przyczyny, z epizodami trwającymi trzy lub więcej godzin dziennie, występującymi trzy dni w tygodniu, przez co najmniej tydzień i nie mające wpływu na rozwój niemowlęcia. Jednakże kryteria rzymskie III zostały również określone jako niezbyt przydatne w praktyce klinicznej, ponieważ wartość graniczna trzech godzin dla płaczu lub marudzenia była arbitralna. Ponadto stwierdzono, że zgłaszanie płaczu niemowlęcia za pomocą dzienniczków płaczu stanowiło wyzwanie dla rodziców i często było zniekształcone przez poziom stresu samego rodzica. W 2017 roku opublikowano kryteria Rzymskie IV, dostarczające kryteriów diagnostycznych dla celów klinicznych, które zostały uzupełnione o dodatkowe kryteria dla celów badawczych.

Kryteria Rzymskie IV to

" Początek i koniec objawów: od urodzenia do < 5 mies.

- Nawracające i przedłużone okresy płaczu, niepokoju, grymaszenia

rozpoczynające się i kończące bez przyczyny, którym rodzice nie mogą zaradzić

- Prawidłowy rozwój, brak gorączki lub innych chorób

- Wszystkie w/w kryteria muszą być spełnione

Pomimo wszystkich tych osiągnięć w dziedzinie diagnostyki kolki niemowlęcej, żadne z opisanych powyżej kryteriów diagnostycznych nie ugruntowało się jako złoty standard w praktyce klinicznej. W codziennym życiu nie jest możliwe, aby rodzice oceniali i dokumentowali czas trwania płaczu przez dłuższy okres czasu za pomocą szczegółowych dzienniczków. W niedawno przeprowadzonym badaniu wśród tureckich pediatrów zdecydowana większość uczestników stwierdziła, że najczęściej rozpoznaje kolkę niemowlęcą na podstawie swojego doświadczenia klinicznego, bez stosowania ścisłych kryteriów diagnostycznych. Jak już wspomniano wcześniej etiologia kolki niemowlęcej nadal nie jest w pełni poznana. W badaniach porównujących mikrobiotę jelitową dzieci z kolką z mikrobiotą dopasowanych wiekowo dzieci bez kolki stwierdzono istotne różnice. Za tym, że zaburzona mikrobiota jelitowa może być zaangażowana w patomechanizm kolki niemowlęcej przemawiają również badania, w których wykazano, że suplementacja mikrobioty jelitowej

produktami zawierającymi probiotyki bakteryjne poprawia nieprawidłowe zachowania niemowląt.

Wykazano, że dysbioza stwierdzona u niemowląt z kolką wiąże się z niskostopniowym ogólnoustrojowym stanem zapalnym charakteryzującym się zwiększonym stężeniem w surowicy interleukiny-8, białka chemotaktycznego monocytów-1 oraz białka zapalnego makrofagów 1 β w porównaniu z niemowlętami bez dolegliwości kolkowych. W niedawno przeprowadzonej metaanalizie wysunięto wniosek, że skuteczność probiotyków w kolce niemowlęcej związana jest z ich właściwościami przeciwzapalnymi. Uznany markerem dla stanu zapalnego jelit jest kalprotektyna kałowa. Charakterystykę kalprotektyny przedstawiono na stronie 13 autoreferatu.

Celem naszej pracy było ustalenie czy ocena stężenie kalprotektyny w kale może być przydatna w diagnostyce kolki niemowlęcej. W badaniach naszych oceniliśmy dzieci pod kątem kolki niemowlęcej za pomocą kryteriów Wessela i oznaczyliśmy u nich poziom kalprotektyny w kale za pomocą komercyjnie dostępnego testu PoC.

W badaniu brały udział niemowlęta w wieku 3-6 tygodni. Kolkę niemowlęcą rozpoznawano na podstawie kryteriów Wessel. Podobnie jak w naszej poprzedniej publikacji kryteriami wykluczającymi z badania było wcześniejsze leczenie probiotykami, synbiotykami, antybiotykami lub płacz z przyczyn organicznych.

Przy włączaniu do grupy badanej informacje o pacjencie dotyczące rodzaju porodu, masy ciała przy urodzeniu, wieku ciążowego i szczegółów żywienia oceniane były za pomocą kwestionariusza wypełnianego przez rodziców wspieranych przez położne lub dietetyków.

Próbki stolca do oznaczenia kalprotektyny kałowej pobierane były od wszystkich zapisanych pacjentów. Próbki pobierano albo podczas wizyty lekarskiej przy współpracy z rodzicami w asyście pielęgniarki, albo w domu przez rodziców zgodnie z instrukcjami dotyczącymi pobierania próbek. We wszystkich przypadkach próbki były zamrażane i przechowywane w temperaturze -18°C do czasu wykonania badań biochemicznych. Stężenia kalprotektyny oznaczano przy użyciu rozszerzonego testu QB®fCAL (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Szwajcaria) w połączeniu z czytnikiem Quantum Blue® Reader II BI-POCTR-ABS (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Szwajcaria).

Metoda warunkowego drzewa wnioskowania zaimplementowana w pakietach party i partykit wykorzystana została do określenia dokładności diagnozowania kolki niemowlęcej na

podstawie zmierzonego poziomu kalprotektyny w kale. W tym celu pacjentów podzielono na dwie grupy: 1- kalprotektyna poniżej 100 $\mu\text{g/g}$ oraz 2- kalprotektyna powyżej lub równa tej wartości. Następnie cały zbiór danych został losowo podzielony na zbiory treningowe i testowe przy użyciu pakietu caret. Zbiór treningowy obejmował 80% wszystkich obserwacji. Następnie przetestowano model wykorzystując przypisanie do grupy kalprotektyny do przewidywania statusu kolki. Dodatkowo oceniono wpływ statusu porodu na dokładność predykcji. Ogólna dokładność predykcji dla obu modeli została obliczona jako średnia poprawnie przewidywanych statusów kolki w zbiorze testowym.

Wyniki:

Charakterystyka pacjentów i zachowanie podczas płaczu.

Nie stwierdzono istotnych różnic między grupą niemowląt bez kolki i grupą niemowląt z kolką pod względem płci, porodu, karmienia i wieku ciążowego. Niemowlęta z kolką miały nieco większą masę urodzeniową i były średnio o około dwa dni młodsze w momencie zgłoszenia do badania.

Dni płaczu w ciągu ostatnich 3 tygodni, średni czas trwania płaczu w ciągu doby oraz średnia liczba faz płaczu w ciągu doby w grupie niemowląt z kolką były istotnie wyższe niż w grupie niemowląt bez kolki.

Poziomy kalprotektyny w kale

Użycie poziomu kalprotektyny w kale 100 $\mu\text{g/g}$ jako wartości granicznej wskazuje, że większość dzieci niekolkowych ma poziom kalprotektyny w kale poniżej tej wartości granicznej, a większość dzieci kolkowych ma poziom powyżej tej wartości. Warto zauważyć, że 9 z 10 niekolkowych niemowląt z poziomem kalprotektyny w kale $\geq 100 \mu\text{g/g}$ zostało urodzonych przez cesarskie cięcie. Jedyne niemowlę w tej grupie, które urodziło się drogą pochwową, miało poziom kalprotektyny w kale 102 $\mu\text{g/g}$, przez co znalazło się tuż powyżej poziomu odcięcia. Analiza statystyczna wykazała, że średni poziom kalprotektyny w kale u niemowląt z kolką jest istotnie wyższy (46,7 $\mu\text{g/g}$; $p < 0,0001$) w porównaniu z poziomem u niemowląt bez kolki.

Analizując zależność średniego poziomu kalprotektyny w kale od płci w grupach niemowląt niekolkowych i kolkowych nie stwierdzono istotnych różnic w obrębie każdej z dwóch grup.

Analizując wpływ rodzaju porodu (drogami natury versus cesarskie cięcie) wykazano, że średni poziom kalprotektyny kałowej u niemowląt urodzonych drogą cięcia cesarskiego był podwyższony zarówno u niemowląt bez objawów jak i tych z objawami kolki.

Badanie kalprotektyny w kale jest badaniem stosunkowo prostym i niedrogim. Przy dobrej organizacji pracy wyniki pomiarów kalprotektyny w kale mogą być dostępne na tyle szybko, że nie będą wymagały dodatkowej wizyty konsultacyjnej. Uwzględnienie wyników pomiaru kalprotektyny w kale pozwolić może pediatrom na uzupełnienie oceny kolki niemowlęcej dokonanej na podstawie informacji zebranych od rodziców. W ten sposób interakcja pediatra - rodzic może skorzystać z twardych faktów uzyskanych dzięki temu obiektywnemu pomiarowi.

Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników badań możemy stwierdzić, iż pediatrzy powinni rozważyć wykonanie pomiaru kalprotektyny w kale w celu wsparcia diagnostyki kolki niemowlęcej. Jak wykazaliśmy, poziom kalprotektyny w kale może wspomóc rozpoznanie kolki jelitowej. Pozwolić to również może na wspomoczenie zdiagnozowania kolki niemowlęcej poprzez zastosowania bardziej obiektywnego pomiaru klinicznego w porównaniu z wyciąganiem informacji od zestresowanych rodziców. Chociaż pomiar kalprotektyny kałowej jest stosunkowo łatwy i szybki problemem pozostaje refundacja wykonania tego badania.

Wnioski:

- 1. W celu optymalizacji terapii kolki niemowlęcej niezbędny jest wybór właściwego preparatu probiotyku dostępnego na rynku. Istotne znaczenie w wyborze właściwego preparatu ma zarówno jego skład jakościowy jak i technologia wytwarzania.**
- 2. Technologia produkcji probiotyków ma decydujące znaczenie w przeżywalności zawartych w nich mikroorganizmów probiotycznych co z kolei warunkuje najlepsze efekty kliniczne preparatu.**
- 3. Wieloszczepowe preparaty synbiotyków są skuteczne w leczeniu kolki niemowlęcej.**
- 4. Stężenia kalprotektyny kałowej jest dobrym, bezinwazyjnym sposobem wspomagania rozpoznania kolki niemowlęcej.**

Piśmiennictwo

1. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggianno GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14.
2. Laforest-Lapointe I, Arrieta MC. Microbial Eukaryotes: a Missing Link in Gut Microbiome Studies. *mSystems*. 2018 Mar 13;3(2):e00201-17. Podolsky SH. Metchnikoff and the microbiome. *Lancet*. 2012 Nov 24;380(9856):1810-1.
3. Parfrey LW, Walters WA, Knight R. Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. *Front Microbiol*. 2011 Jul 11;2:153.
4. Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Dig Liver Dis*. 2015 Dec;47(12):1007-12.
5. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787-803.
6. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):85-93.
7. Buffie, C., Pamer, E. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13, 790–801.
8. Khan I, Bai Y, Zha L, Ullah N, Ullah H, Shah SRH, Sun H, Zhang C. Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Dec 23;11:716299.
9. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb Pathog*. 2019 Mar;128:171-177.
10. Erttmann, S.F., Gekara, N.O. Hydrogen peroxide release by bacteria suppresses inflammasome-dependent innate immunity. *Nat Commun*. 2019;10:3493.

11. Dordević D, Jančíková S, Vítězová M, Kushkevych I. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. *J Adv Res.* 2021; 27:55-69.
12. Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ, The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26(2):137–142.
13. Weis, GA, Hennet, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(16):2959-2977.
14. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest.* 2014 Oct;124(10):4212-8.
15. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J.* 2015 Jul;56(7):366-7.
16. Bentley R. Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence beta-lactams). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36(6):775-86.
17. Ligon BL. Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004 Jan;15(1):52-7.
18. Fuller R (Ed.). *Probiotics – The Scientific Basis.* Chapman & Hall, London,1992.
19. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Aug;11(8):506-14.
20. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun;125(6):1401-12.
21. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods.* 2019;8(3):92. Published 2019 Mar 9.

22. Kolida S, Gibson GR. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011;2:373-93.

4.3 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

Pozostałe publikacje związane z uzyskaniem tytułu doktora nauk medycznych.

Moje zainteresowania naukowe po ukończeniu studiów skupiały się na zagadnieniach związanych z badaniem czynników regulujących homeostazę energetyczną takich jak grelina, leptyna, insulina, adiponektyna oraz insulinowrażliwość w stanach fizjologicznych i patologicznych człowieka. Efektem mojej aktywności naukowej w tym obszarze były 4 pełne publikacje naukowe o łącznym IF 4,156 i punktacji MEiN - 75 oraz 2 streszczenia zjazdowe na konferencjach międzynarodowych. Zagadnienia te były również tematem przygotowanej przeze mnie monografii - „Ocena czynników regulujących homeostazę energetyczną i ich korelacje z wykładnikami gospodarki lipidowej u kobiet w okresie pre-menopauzalnym” będącej podstawą do uzyskania stopnia doktora nauk medycznych.

Moja pierwsza publikacja w tym obszarze (*“Fasting and postprandial levels of ghrelin, leptin and insulin in lean, obese and anorexic subjects”*) dotyczyła badania korelacji pomiędzy stanem odżywienia a stężeniem leptyny, greliny i insuliny w osoczu osób szczupłych, otyłych i anorektycznych. Uzyskane przez nas wyniki badań pozwoliły stwierdzić, iż podstawowe stężenie ghreliny, leptyny i insuliny w osoczu zależne jest od stanu odżywienia. Upośledzone wydzielanie greliny i leptyny oraz zmieniona wrażliwość tkanek docelowych na insulinę są bez wątpienia zaangażowane w patogenezę zaburzeń odżywiania.

Kolejna praca z tego zakresu dotyczyła potencjalnego wpływu liposukcji na hormony tkanki tłuszczowej biorące udział w regulacji równowagi energetycznej człowieka. Praca ta miała charakter pogładowy. W kolejnych pracach oryginalnych, wraz z zespołem badawczym w którego skład wchodziłam oceniliśmy zmiany metaboliczne po zabiegu liposukcji brzusznej u mężczyzn z nadwagą o podobnym stylu życia, bez zmian w aktywności fizycznej po zabiegu, bez chorób współtowarzyszących za wyjątkiem cukrzycy typu II. Uzyskaliśmy tym samym relatywnie jednorodną grupę badawczą z podziałem na pacjentów z cukrzycą i bez cukrzycy. Wyniki naszych badań pozwoliły stwierdzić, iż liposukcja jest metodą przynoszącą korzyści krótko i długofalowe związane z poprawą insulinowrażliwości zarówno dla cukrzyków, jak i pacjentów bez cukrzycy. Ciekawą obserwacją w naszej pracy był brak zmian w surowiczych stężeniach adipokin oraz receptora dla leptyny.

Niedobór estrogenów po menopauzie wywołuje szereg zmian, których konsekwencją jest pojawienie się kardiometabolicznych czynników ryzyka (otyłość brzuszna, dysfunkcja

adipocytów, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze i inne). Ze względu na rolę jaką leptyna i adiponektyna odgrywają w procesach metabolicznych, wydają się one być dobrymi wskaźnikami oceniającymi stan metaboliczny u kobiet w tym okresie życia. Tym bardziej, że ich stężenia zmieniają się wraz z rozpoczęciem okresu przekwitania. Mechanizmy prowadzące do powyższych zmian nie zostały jak dotąd do końca wyjaśnione. Spośród wielu możliwych przyczyn obserwowanego zjawiska bardzo prawdopodobna wydaje się być predyspozycja genetyczna. Wiadomo, że polimorfizm ApoE wpływa na ryzyko rozwoju zmian kariometabolicznych. Stąd podstawowym celem naszych kolejnych badań było wykazanie, związku pomiędzy nosicielstwem poszczególnych alleli genu ApoE, a stężeniem w surowicy hormonów wpływających na homeostazę energetyczną u kobiet po menopauzie. Analizując poszczególne układy alleliczne genu apoE ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ oraz $\epsilon 4/\epsilon 4$) stwierdziliśmy, że częstość ich występowania w grupie badanej była podobna do rozkładu częstości genotypów i alleli obserwowanego w populacji polskich kobiet po menopauzie. Analizując profil lipidowy zaobserwowaliśmy, że nosicielki genu $\epsilon 4(+)$ (heterozygoty $\epsilon 3/\epsilon 4$ oraz homozygoty $\epsilon 4/\epsilon 4$) charakteryzowały się większym stężeniem aterogenicznej frakcji LDL-cholesterolu (LDL-ch) oraz mniejszym stężeniem triacylogliceroli (TAG) w porównaniu z kobietami $\epsilon 4(-)$ (heterozygoty $\epsilon 2/\epsilon 3$ oraz homozygoty $\epsilon 3/\epsilon 3$). Ponadto badania nasze wykazały, że stężenia leptyny były istotnie niższe u homozygot $\epsilon 4/\epsilon 4$ w porównaniu z pozostałymi badanymi grupami. Nie stwierdziliśmy natomiast istotnych korelacji pomiędzy poszczególnymi składowymi profilu lipidowego, a adiponektyną, czy leptyną u kobiet z grupy $\epsilon 4/\epsilon 4$. Uzyskane wyniki wskazują, iż leptyna i adiponektyna uczestniczą w wieloczynnikowym procesie przemian tłuszczów u kobiet po menopauzie, zaś obecność układu allelicznego $\epsilon 4/\epsilon 4$ predysponuje do dysregulacji wpływu leptyny i adiponektyny na metabolizm lipidów oraz do bardziej aterogenicznego profilu lipidowego u kobiet po menopauzie. Doniesienia te mają przydatność kliniczną szczególnie w aspekcie rozwoju farmakogenomiki dając podstawy do opracowania działań profilaktycznych oraz terapii spersonalizowanych, dobranych do uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych pacjenta.

Kontynuacją i konsekwencją moich powyższych zainteresowań naukowych była przygotowana przeze mnie rozprawa doktorska w postaci monografii pt. „Ocena czynników regulujących homeostazę energetyczną i ich korelacje z wykładnikami gospodarki lipidowej u kobiet w okresie pre-menopauzalnym”.

W mojej pracy doktorskiej zajęłam się określeniem zmian w profilu metaboliczno-hormonalnym kobiet w okresie pre-menopauzalnym w porównaniu z kobietami w wieku

reprodukcyjnym o takim samym współczynniku BMI. Pozwoliło to na wykluczenie efektu otyłości na analizowane parametry. Uzyskane przeze mnie wyniki badań wykazały, że pomimo braku zmian we współczynniku BMI oraz stężeniu glukozy w surowicy krwi, poziom triglicerydów oraz cholesterolu był wyższy u kobiet w okresie premenopauzalnym. Ponadto w badaniach mich stwierdziłam również, że w grupie kobiet w okresie premenopauzalnym poziom insuliny, leptyny, greliny całkowitej oraz aktywnej, oraz FSH wzrastał, podczas gdy stężenie adiponektyny, receptora leptyny OB.-R, estrogenów spadało. Wykazałam również wzrost poziomu insulinooporności u kobiet w grupie badanej, co odzwierciedlone zostało we wzroście indeksu HOMA-IR. W mojej pracy doktorskiej wykazałam pozytywną korelację pomiędzy stężeniem FSH oraz greliną całkowitą i aktywną, leptyną, insuliną. Podczas gdy negatywna korelacja obserwowana była pomiędzy FSH i adiponektyną oraz OB.-R. Dodatkowo wykazałam pozytywną korelację pomiędzy stężeniem estrogenów oraz OB-R i adiponektyną, a także negatywną z greliną całkowitą, aktywną, leptyną i insuliną. Pomimo braku zmian w indeksie BMI udowodniłam, że w okresie premenopauzalnym występuje wzrost insulino-oporności oraz stężenia hormonów współodpowiedzialnych za to zjawisko (leptyna, insulina, grelina). Na podstawie uzyskanych w mojej pracy doktorskiej wyników badań wnioskować można, że zmiany w poziomie badanych hormonów w okresie premenopauzalnym prowadzić mogą do wystąpienia schorzeń takich jak zespół metaboliczny, otyłość, czy też cukrzyca w okresie menopauzalnym.

Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych i zatrudnieniu w Akademii Kaliskiej rozpoczęłam pracę naukową poświęconą tematyce związanej z probiotykami. Zagadnienia te stały się podstawą do ubiegania się przeze mnie o stopień doktora habilitowanego nauk o zdrowiu. Poza cyklem prac opisujących moje osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę o ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego, jestem w tym obszarze współautorem 5 prac oryginalnych o łącznym współczynniku IF - 10,452 i punktacji MEiN - 385. Ponadto wyniki moich prac wielokrotnie prezentowałam w formie wykładów i streszczeń na konferencjach naukowych.

Pozostałe prace naukowe opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych a związane z moim głównym nurtem badawczym dotyczą takich zagadnień jak:

1. możliwość zastosowania probiotyków w leczeniu przewlekłych infekcji bakteriami *Salmonella enterica*. W publikacji naszej dotyczącej tego zagadnienia wykazaliśmy, iż

wieloszczepowy produkt synbiotyczny zawierający dziewięć różnych bakterii probiotycznych, *B. longum* Bl-05, *L. rhamnosus* Lr-32 oraz *L. plantarum* Lp-115. *B. breve* Bb-03, *B. bifidum* Bb-02, *L. helveticus* SP-27, *S. thermophiles* St-21, *L. lactis* Ll-23, *L. casei* Lc-11 oraz składnik prebiotyczny FOS wykazał się skutecznością w leczeniu przewlekłej infekcji *Salmonella enterica*. Mikroorganizmy zawarte w tym preparacie probiotyku wykazywały się również wysoką adhezyjnością do komórek nabłonka jelitowego Caco-2 co prawdopodobnie warunkuje ich kliniczną skuteczność.

2. badania „in vitro” hamowania bakterii patologicznych przez probiotyki i synbiotyki. Na podstawie opublikowanej na ten temat pracy stwierdziliśmy, iż badanie hamowanie wzrostu „in vitro” różnych patogenów może być pomocne w różnicowaniu przydatności produktów rynkowych zawierających mikroorganizmy probiotyczne w praktyce klinicznej. Na podstawie wyników naszego badania stwierdziliśmy, iż probiotyki wieloszczepowe powinny być preferowane w przypadku, gdy pożądanym jest silne hamowanie wzrostu in-vitro szerokiej gamy patogenów. Ponadto uznaliśmy, iż wyniki naszych badań mogą pomóc w wyborze produktów do przyszłych badań klinicznych.

3. możliwości wykorzystania probiotyków wieloszczepowych w leczeniu infekcji bakteriami *Clostridium difficile* – opornymi na Klindamycynę. Rozprzestrzenianie się hiperwirulentnych, epidemicznych szczepów *C. difficile* (np. rybotyp 027), które często są wielolekooporne na główne kategorie antybiotyków, staje się coraz większym problemem dla służby zdrowia na całym świecie. Możliwość zahamowania wzrostu in vitro wielolekoopornych *C. difficile* przez niektóre synbiotyki wieloszczepowe sugeruje, że produkty te mogą odgrywać korzystną rolę w leczeniu nawrotowych infekcji tymi bakteriami. Aktualnie prowadzimy dalsze badania na ten temat.

4. problemy infekcji bakteriami *C. difficile* opornymi na Klindamycynę w stomatologii. Pacjenci lekarzy stomatologów są coraz bardziej świadomi skutków ubocznych stosowania antybiotyków, a w szczególności Klindamycyny. Solidna wiedza na temat potencjalnych skutków ubocznych Klindamycyny, roli *C. difficile* w niepożądanych działaniach tego antybiotyku oraz możliwości złagodzenia skutków ubocznych poprzez jednoczesne stosowanie produktów zawierających mikroorganizmy probiotyczne, pomoże lekarzom denty stom w rozwiązaniu tego problemów. Wyniki eksperymentów „in-vitro” dotyczących hamowania wzrostu *C. difficile* mogą stanowić wskazówkę przy wyborze najlepszego

produktu probiotyku, przynajmniej tak długo, jak długo nie będą dostępne dane z badań klinicznych.

Ponadto jestem współautorem publikacji kazuistycznej dotyczące infekcji bakteriami patologicznymi w przebiegu szerokospektralnej antybiotykoterapii chorego leczonego z powodu COVID-19.

Niektórzy producenci ulotkach przylekowych zalecają wstępną inkubację preparatu przed spożyciem przy użyciu wody o temperaturze pokojowej. W badaniach naszych wykazaliśmy, iż zalecenie to nie ma znaczącego wpływu na ogromną redukcję CFU spowodowaną ekspozycją na niskie pH. Wyniki tych badań opublikowane zostały w Journal of Health Study and Medicine (Malgorzata Bernatek, Jacek Piątek, Henning Sommermeyer “Pre-incubation of probiotics before intake: A reasonable recommendation?”)

W kolejnej publikacji (Malgorzata Bernatek, Margarita Grzemska, Jacek Piątek, and Henning Sommermeyer “Probiotics and synbiotics: The consumers perspective”) która ukazała się w tym roku w Journal of Health Study and Medicine przedstawiliśmy zagadnienia związane z przyjmowaniem probiotyków z perspektywy pacjentów. Przeprowadzone badanie ankietowe wykazało, że decyzja o wyborze preparatu probiotyku zależy od wcześniejszych doświadczeń, zaleceń lekarza i w mniejszym stopniu od zaleceń farmaceuty. Wiedza konsumentów na temat istotnych cech produktu jest ograniczona. Wyniki badania pokazują, że lekarze i w mniejszym stopniu farmaceuci mogą odgrywać kluczową rolę w racjonalnym stosowaniu probiotyków.

Na mój całkowity dorobek naukowy składa się 19 publikacji z czego w 12 jestem wiodącym (pierwszym, drugim lub ostatnim autorem). Łączna wartość IF moich publikacji wynosi 33,412 a punktacja MNiSW - 890. Całkowita liczba cytowań wg Web of Science wynosi 92 a indeks Hirsha – 6.

- 5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

W roku 2013 będąc pracownikiem Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu we współpracy z Instytutem Medycyny Wsi w Lublinie przygotowałam dwa rozdziały do monografii - „Wpływ hormonów regulujących homeostazę energetyczną na czynność układu krążenia” i „ Mikotoksyny - ukryty zabójca” Monografie opublikowane zostały jako materiały zjazdowe międzynarodowej konferencji naukowej, która miała miejsce w roku 2013 we Lwowie na Ukrainie.

W roku 2017 na kongresie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (27th Congress of the Polish Physiological Society. Białystok) przedstawiłam streszczenie pracy “Metabolic and hormonal changes in perimenopausal women”, która po rozwinięciu była podstawą do nadania mi tytułu doktora nauk medycznych.

Od ukończenia studiów na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w 2011 roku brałam udział we wszystkich Polsko-Niemieckich Konferencjach Naukowych odbywających się corocznie w sierpniu w Kołobrzegu. Początkowo mój udział miała charakter bierny. W ostatnich 3 konferencjach byłam członkiem komitetu organizacyjnego konferencji. Wygłosiłam również w trakcie ich trwania 2 wykłady:

W roku 2021 - “COVID-19 and Clostridioides difficile Infections - Clinical Challenges” oraz w roku 2022 - „Czynniki determinujące efektywne działanie probiotyków - ocena przeżywalności i aktywności przeciwbakteryjnej wybranych produktów probiotycznych: badanie invitro”

W roku 2022 streszczenie pracy Abstract-Nr.: 51760, DGKJ-FV 03 Welche Rolle spielen gastrointestinale Entzündungsprozesse bei infantiler Kolik? (której jestem współwykonawcą) zaprezentowana została na Niemieckim zjeździe pediatrycznym (Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ), der Deutschen Gesellschaft für Sozialpädiatrie und Jugendmedizin (DGSPJ), der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie (DGKCH), des Berufsverbandes Kinderkrankenpflege Deutschland (BeKD) und der Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie (GPR).

W maju tego roku brałam udział w konferencji naukowej zorganizowanej przez Uczelnię Medyczno-Społeczną w Warszawie.

Przedstawiłam tam streszczenia dwóch prac naukowych, których jestem współautorem.

"Effect of microencapsulation on osmotic resistance of probiotic microorganisms."

Malgorzata Bernatek, MD, PhD, Henning Sommermeyer PhD, Wanda Olesińska, Anna Kubiak MD, Prof. Jacek Piątek

oraz “The Recent Increase of Infections with Multi-drug Resistent NDM-1 Klebsiella pneumoniae Triggered by the War in Ukraine – A Challenge for Healthcare in Europe”
Henning Sommermeyer, Małgorzata Bernatek and Jacek Piątek
Department of Health Sciences, Calisia University, Poland.

Na XII Polsko-Niemieckiej Konferencji Medycznej "Zdrowie Rodziny w Polsce i w Niemczech", Kołobrzeg, sierpień 2023 rok byłam autorem dwóch streszczeń i wykładów:

Prof. dr hab. med Jacek Piątek, Dr med. Małgorzata Bernatek

„Kryteria doboru probiotyków” oraz

Dr med. Małgorzata Bernatek

„Wybór najlepszego probiotyku - z perspektywy pacjentów”

Praca pt “A study on the incidence of adverse post-vaccination reactions and adverse medical events after COVID-19 vaccinations in Poland”, której jestem współautorem otrzymała nagrodę na III Światowej Konferencji Zdrowia Rodziny w Akademii Kaliskiej 12 czerwca, 2023|

W roku 2020 odbyłam staż szkoleniowy w Klinice Santa Marija, Triq ir-Rettur Dun Salv Farrugia, Zurrieg, Malta, z zakresu medycyny rodzinnej

Jestem recenzentem prac w czasopismach naukowych - między innymi „Microorganisms” współczynnik IF - 4.500

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Dydaktyczne

Przez cały czas pracy zarówno w Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu jak i w Akademii Kaliskiej prowadzę zajęcia ze studentami na wszystkich kierunkach Wydziału Nauk o Zdrowiu. Biorę czynny udział w przygotowywaniu seminariów, ćwiczeń, konsultacji oraz sprawdzianów. Jestem autorem materiałów dydaktycznych zawierających konspekty oraz materiały audio-wizualne dotyczących fizjologii człowieka, patofizjologii oraz chorób wewnętrznych Opracowanie przez siebie materiałów dydaktycznych przyczyniło się do ujednolicenia i unowocześnienia treści dydaktycznych przekazywanych studentom

Przygotowywanie materiałów do e-learningu:

- Celem podniesienia efektywności nauczania, jak i jakości rozwoju interdyscyplinarnego przyszłych absolwentów biorę udział w przygotowaniu nowych metod nauczania problemowego (PBL - problem based learning).

PBL należy do metod nauczania coraz bardziej rozpowszechnianych na świecie. Zajęcia fizjologii metodą PBL opierają się na współpracy i wzajemnym zaangażowaniu studentów w rozwiązywanie problemów natury klinicznej w oparciu o mechanizmy fizjologiczne. Metody te wykorzystane zostaną w nowo utworzonym w Akademii Kaliskiej kierunku lekarskim.

- W ramach wprowadzania nowoczesnych technik nauczania - przygotowanie materiałów do korzystania z platformy edukacyjnej OLAT

6.2 Organizacyjne

Od 2020 roku jestem członkiem Rady Naukowej Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Akademii Kaliskiej im Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego.

Brałam i nadal biorę aktywny udział w tworzeniu Kierunku Lekarskiego w ramach Akademii Kaliskiej.

Jestem członkiem towarzystw naukowych

Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego

Polskiego Towarzystwa Medycyny Rodzinnej

Byłam członkiem komitetu organizacyjnego:

IX. Polsko-Niemieckiej Konferencji Naukowej

Kołobrzeg 24-26.08. 2020r.

X. Konferencji Polsko - Niemieckiej „Zdrowie Rodziny w Polsce i w Niemczech”

Kołobrzeg 23-25 sierpień, 2021 r.

XI. Konferencji Polsko - Niemieckiej „Zdrowie Rodziny w Polsce i w Niemczech”

Kołobrzeg 17-19 sierpień, 2022 r. oraz

XII. Konferencji Polsko - Niemieckiej „Zdrowie Rodziny w Polsce i w Niemczech”

Kołobrzeg sierpień, 2023

6.3 Popularyzujących naukę

We współpracy z firmą Medical Solutions biorę udział w cykl wykładów popularyzujących naukę i profilaktykę zdrowotną.

W trakcie rekrutacji biorę udział w spotkaniach z młodzieżą szkół średnich Kalisza promujących naukę oraz naszą uczelnię.

Wchodzę w skład komitetu redakcyjnego czasopisma „Żyj Naturalnie” gdzie zajmuję się popularyzowaniem zagadnień naukowych związanych z probiotykami oraz promocją zdrowego trybu życia. W czasopiśmie tym rozpoczęłam cykl publikacji na powyższe tematy. Ostatni artykuł: Małgorzata Bernatek – „Zdrowie tkwi w jelitach” - **Żyj Naturalnie**

- 7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

.....
(podpis wnioskodawcy)