



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

ZAKŁAD BIOLOGII MEDYCZNEJ

dr hab. Aleksandra Wesołowska
Pracownia Badań nad Mlekiem Kobięcym i Laktacją
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Litewska 14/16
00-575 Warszawa

Warszawa, 30.11.2023

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: Bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym

Autor: mgr Katarzyna Łubiech

Promotor: dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Zakres tematyczny i zawartość Rozprawy

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Katarzyny Łubiech dotyczy niezwykle ważnego zagadnienia związanego z obecnością w mleku kobiecym bakterii kwasu mlekowego z rodziny *Lactobacillaceae*. Wykrycie przeszło 10 lat temu *Lactobacillus gasseri* w mleku matek i kale karmionych piersią dzieci dało początek poszukiwaniom znaczenia istnienia mikroorganizmów w mleku kobiecym, które wcześniej traktowano jak zanieczyszczenia. Ostatnie lata przyniosły dowody na wielokierunkowe pozytywne działanie mikrobioty mleka matki jako kluczowego czynnika oddziałującego na zdrowie noworodków, a także niemowląt i dzieci na dalszych etapach życia.

Nic więc dziwnego, że większość prowadzonych obecnie badań skupia się na ustaleniu czynników wpływających na różnorodność mikrobiologiczną mleka matki oraz określeniu składu jakościowego i ilościowego części korowej tego złożonego ekosystemu.

W nurt tych prac doskonale wpisuje się rozprawa Pani mgr Katarzyny Łubiech przedstawiona mi do recenzji.

Doktorantka osadza jednak swoje badania nad mlekiem kobiecym w szerszym kontekście interpretując wyniki prowadzonych eksperymentów przez pryzmat promocji karmienia piersią i wspierania optymalnego sposobu żywienia noworodka.

Teoretyczny wstęp pracy rozpoczyna się więc od opisu istoty i złożonej roli karmienia piersią. Następnie znajduje się omówienie udokumentowanych i postulowanych czynników środowiskowych, genetycznych oraz immunologicznych które determinują skład i funkcjonowanie mikrobiomu mleka matki. Do opisanych we wstępie czynników które wpływają na obecność i typ mikroorganizmów doktorantka odnosi się szczegółowo w badawczej części pracy. Należą do nich: wiek matki w chwili porodu, rodzaj porodu, miejsce zamieszkania, stan zdrowia matki, etap laktacji, skład mleka pod kątem oligosacharydów, odżywcza wartość pokarmu, restrykcje i zwyczaje żywieniowe matki. W dalszych częściach wstępu omówione zostały ostatnie zmiany w taksonomii przedstawicieli bakterii fermentacji mlekowej które są istotne nie tylko dla nauki, ale także z punktu widzenia praktycznego wykorzystania w przemyśle.

Przedstawiona do recenzji praca, licząca 126 stron, ma układ typowy i po wstępie znajduje się opis celu pracy i przedstawienie hipotez badawczych. Doktorantka przyjęła sobie za cel określenie częstości występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym, w populacji polskich kobiet karmiących piersią oraz scharakteryzowanie czynników środowiskowych oraz matczynych mogących mieć wpływ na jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego. Dodatkowym aspektem pracy było określenie właściwości bakterii należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego oraz możliwości ich praktycznego wykorzystania.

Wyznaczony przez doktorantkę cel był bardzo ambitny ze względu na liczne wyzwania i ograniczenia związane z technicznymi aspektami badania mikroorganizmów mleka kobiecego, w szczególności hodowli *Lactobacillaceae*, ale także ze względu na ogromną zmienność wewnątrz- i międzyosobniczą wśród drobnoustrojów odnajdywanych w pokarmie kobiet karmiących piersią.

W pracy zastosowano różnorodne metody pozwalające na identyfikację bakterii w tym posiew mikrobiologiczny, ocena mikroskopowa, testy biochemiczne oraz techniki biologii molekularnej oraz metody spektroskopowe.

Dodatkowo wykorzystano metody hodowli komórkowej do oceny wpływu metabolitów postbiotycznych pochodzących ze szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego, na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach *in vitro*. Skorzystano też z zaplecza sprzętowego Regionalnego Banku Mleka w Toruniu do analizy składu mleka pod kątem odżywczym, a do oceny zawartości oligosacharydów w mleku kobiecym zastosowano urządzenia analityczne dostępne dzięki nawiązanej współpracy z Politechniką Gdańską. Na uznanie zasługuje wysoka dbałość o prawidłowy dobór metod w celu oznaczenia wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych szczepów oraz podłoży umożliwiających oznaczanie minimalnego stężenia hamującego badanych związków.

Szeroki wachlarz technik laboratoryjnych i metod analitycznych świadczy o właściwie dobranej metodyce umożliwiającej osiągnięcia założonych celów naukowych.

Moją uwagę zwrócił jedynie brak szczegółowego opisu zasad pobierania i przechowywania próbek mleka - znajduje się tylko wzmianka, że mleko było pobierane w godzinach porannych z zachowaniem zasad higieny. Tym niemniej uzyskane wyniki badań mikrobiologicznych mleka pod względem ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych wskazują na wysoki poziom reżimu higienicznego, gdyż potwierdzono niską kontaminację mikrobiologiczną pobranych próbek.

Nie znalazłam też informacji jaka objętość pokarmu była pobierana i czy była ona porównywalna pomiędzy uczestniczkami oraz czy pobierano mleko pierwszej czy drugiej fazy, w jakiej temperaturze próbki było przechowywane do czasu podzielenia na porcje na poszczególne analizy. Tymczasem wskazuje się, że różnorodne protokoły pobierania ludzkiego materiału do badań mikrobiologicznych są głównym źródłem rozbieżnych wyników – niedawno zaproponowano listę kontrolną STORMS dla ujednolicenia sposobu prowadzenia i raportowania badań w obszarze ludzkiej mikrobioty.

W przypadku recenzowanej pracy materiał badany stanowiły próbki mleka pobrane jednorazowo od 63 uczestniczek, które rekrutowano bez wskazania kryteriów związanych z okresem jaki minął od porodu. Brak założeń związanych z włączeniem do

badania kobiet znajdujących się na określonym etapie laktacji oraz przekrojowy charakter badania bez kontynuacji pobierania próbek mleka w kolejnych miesiącach laktacji powoduje ograniczenia w interpretacji uzyskanych wyników, gdyż jednym z czynników determinujących różnorodność mikroflory może być etap laktacji.

W pracy zastosowano autorski kwestionariusz ankiety który był źródłem ważnych informacji demograficznych, danych związanych z porodem oraz sposobem żywienia dziecka w chwili pobierania próbki do badania. Kwestionariusz zawierał też pojedyncze pytania o nawyki żywieniowe które mogą mieć potencjalnie znaczenie dla obecności badanych bakterii.

Wyniki pracy przedstawiono na 42 stronach w przejrzysty sposób ułatwiający czytelnikowi ich interpretację. Tam, gdzie było to możliwe przeanalizowano je z podziałem na dwie grupy – dla matek z których mleku potwierdzono obecność bakterii z *Lactobacillaceae* i tych w których mleku nie wykryto bakterii. Grupa kobiet u których zidentyfikowane bakterie należące do *Lactobacillaceae* liczyła 14 uczestniczek, podczas gdy u pozostałych 49 nie potwierdzono obecności bakterii probiotycznych w pobranych próbkach. Ze względu na dysproporcje liczbową porównywanych grup w wielu przypadkach nie przeprowadzono analiz statystycznych lub nie wykazano istotności statystycznej zauważonych różnic, co jest obiektywną słabością pracy.

Pomimo że wiele z zauważonych przez doktorantkę zależności jest potwierdzeniem danych literaturowych to jednak na podkreślenie zasługuje fakt, że przedstawiona do recenzji praca, według mojej wiedzy, stanowi pierwsze tego typu badanie dotyczące polskiej populacji kobiet karmiących piersią.

W toku wielowątkowej, ale uporządkowanej logicznie, dyskusji autorka zestawiała otrzymane wyniki do dostępnych danych literaturowych podkreślając ograniczenia metodologiczne wpływające na trudności w interpretacji i wnioskowaniu na podstawie badań własnych. Szczególnie dotyczy to testów wrażliwości szczepów bakterii *Lactobacillaceae* na poszczególne grupy antybiotyków.

Rozprawę kończy zwięzłe podsumowanie i poprawnie sformułowane wnioski.

Istotne i oryginalne elementy Rozprawy

Do istotnych elementów pracy które decydują o jej dużej wartości naukowej i praktycznej zaliczam:

1. Imponujący zakres badania pod kątem metodologii, zastosowanych technik laboratoryjnych i narzędzi analitycznych.
2. Praktyczny aspekt uzyskanych wyników w szczególności w zakresie ich wykorzystania do odtwarzania mikrobioty w utrwalanym mleku kobiecym, w uzupełnianiu terapii antynowotworowych oraz planowaniu bezpiecznej antybiotykoterapii dla pacjentek w ciąży i w czasie laktacji
3. Potwierdzenie wysokiej wartości odżywczej mleka kobiet karmiących dłużej niż rok - co ma ogromne znaczenie w kontekście promocji długiego i efektywnego karmienia piersią w Polsce.

Uwagi krytyczne

1. Najpoważniejszym ograniczeniem przedstawionej do recenzji pracy jest niewystarczająca liczba pobranych próbek mleka, która zdecydowała o tym, że w wielu aspektach nie można dokonać analizy porównawczej pomiędzy obiema grupami – matek których mleko zawierało bakterie z *Lactobacillaceae* oraz tych w których mleku ich nie zidentyfikowano.
2. Moje wątpliwości wzbudza przedstawienie zmian składu mleka w przebiegu 24 miesięcy laktacji (wykres nr 4-9) na podstawie wyników pochodzących z analiz składu mleka pobranego raz do badania z właściwego dla danej pacjentki etapu laktacji. Pomimo że przeprowadzona analiza potwierdziła dobrze znane z literatury zależności dotyczący zmian składu mleka z upływem czasu od porodu to w świetle wiedzy o różnicach osobniczych i różnej dynamice zmian u każdej kobiety, takie zestawienie nie wydaje mi się do końca uzasadnione.

3. W nawiązaniu do powyższych uwag zastanawiam się, dlaczego nie zdecydowano się na badanie prospektywne przy udziale pacjentek włączonych do badania np. w pierwszym miesiącu laktacji i dlaczego nie wykorzystano szpitala jako dogodnego miejsca rekrutacji matek noworodków.
4. Do analizy wpływu zwyczajów żywieniowych i diety na obecność mikroorganizmów w mleku matek powinno się moim zdaniem zastosować kwestionariusz częstości spożycia żywności tzw. FFQ (Food Frequency Questionnaire). Kwestionariusz częstości spożycia pozwala na uzyskanie odpowiedzi na pytanie, jak często spożywane są poszczególne produkty lub grupy produktów w określonym przedziale czasu (dzień, tydzień, miesiąc). Składowymi kwestionariusza są: dokładana lista spożywanych produktów oraz informacje o częstości spożycia poszczególnych produktów i potraw w określonym czasie w przeszłości np. w minionym miesiącu, półroczu, roku. Zadawanie pytania matkom niemowląt „ jak często” bez odniesienia do okresu czasu np. „Jak często w ciągu ostatniego miesiąca” jest bardzo ryzykowne, gdyż wiadomo, że okres ciąży i laktacji to czas wielu zmian życiowych także tych związanych z codziennym funkcjonowaniem i dietą. Pełniejsza lista produktów byłaby szczególnie wskazana przy pytaniu o żywność wysokoprzetworzoną gdyż jest to dużo pełniejsze pojęcie niż wskazana „żywność instant”.

Uwagi redakcyjne

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie i estetycznie pod kątem składu i edycji tekstu, z wykorzystaniem wielu kolorowych zdjęć i schematów. Już sama szata graficzna okładki zachęca do lektury !

Natknęłam się na jedną niespójność w przywołaniu definicji karmienia piersią za WHO/APP która najprawdopodobniej wynika z błędu tłumaczenia. W pierwszym zdaniu rozprawy doktorantka o karmieniu pokarmem kobiecym doprecyzowując, że chodzi o karmienie piersią lub odciągniętym mlekiem kobiecym, tymczasem zgodnie z definicją WHO karmienie piersią to karmienie mlekiem kobiecym podanym wprost z piersi lub odciągniętym. Z takiej definicji karmienia piersią wynika to, że wg. WHO dzieci które nie są przystawiane do piersi w pierwszym półroczu ale są karmione

mlekiem odciągniętym są uznane za karmione wyłącznie piersią o ile otrzymują pokarm matki bez dodatku wody, innych napojów z wyjątkiem podaży witamin i leków.

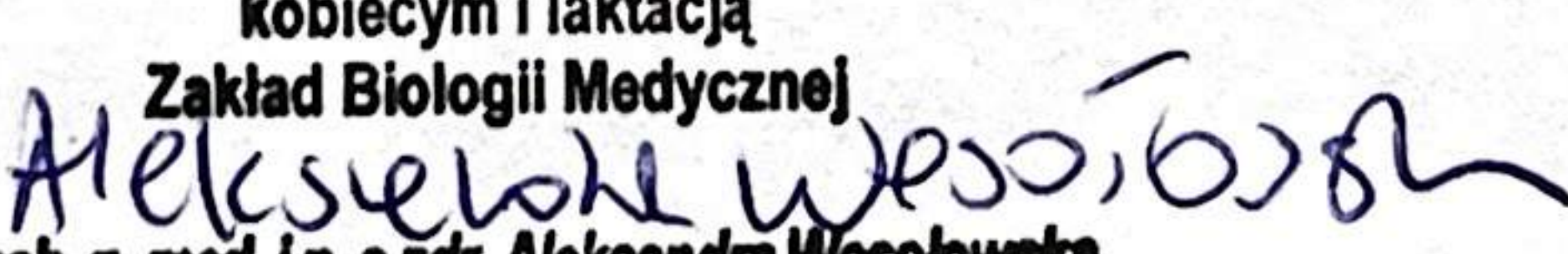
Wnioski końcowe

Pani Katarzyna Łubiech wykazała się szeroką wiedzą z zakresu planowania i przeprowadzenia badań z wykorzystaniem próbek na cele złożonych badań mikrobiologicznych. Sposób prezentacji wyników pochodzących z doświadczeń z użyciem wielu technik dowodzi także że posiadała umiejętność opracowania bogatego materiału biologicznego poddanego wnikliwej analizie.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne są raczej zachętą do dalszych badań i stawiania sobie nowych wyzwań związanych z badaniami mikrobioty mleka kobiecego, i w niewielkim stopniu obniżają bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy.

Stwierdzam, że rozprawa p.t. „**Bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym** „, spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnoszę więc o dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach przewodu doktorskiego Pani mgr Katarzyny Łubiech

Podpis

Kierownik pracowni badań nad mlekiem
kobięcym i laktacją
Zakład Biologii Medycznej

dr hab. n. med. i n. o zdr. Aleksandra Wesółowska