



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, 24.01.2023

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: Ochratoksyna A w mleku, moczu i surowicy krwi oraz zearalenon w moczu kobiet będących w okresie laktacji

Autor: mgr Karolina Ropejko

Promotor: dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Zakres tematyczny i zawartość Rozprawy

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Karoliny Ropejko dotyczy niezwykle ważnego tematu biomonitoringu mikotoksyn z wykorzystaniem mleka kobiecego oraz innych płynów ustrojowych kobiet w okresie okołoporodowym. Mikotoksyny to wtórne metabolity grzybów pleśnowych wytwarzane przez rodzaj *Aspergillus*, *Penicillium*, czy *Fusarium*; które są jedną z głównych naturalnie występujących klas toksyn wykrywanych w żywności przeznaczanej dla ludzi pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego. Jako biomarkery wybrano ochratoksynę A (OTA) oraz zearalenon (ZEN) i jego metabolity. Praca porusza zagadnienia oceny zawartości tych związków w mleku, surowicy krwi i moczu kobiet w okresie laktacji. Podjęcie tej tematyki ma ogromne znaczenie ze względu na to, że mleko kobiece które jest pierwszym i optymalnym pokarmem dla ludzkiego noworodka, może być też źródłem toksycznych substancji pochodzących z żywności lub ze środowiska. Część uczestniczek przeprowadzonego badania stanowią honorowe dawczynie pokarmu kobiecego, które nie tylko karmią

piersią własne potomstwo, ale także oddają mleko do banku mleka na użytek dzieci potrzebujących. Kontrola jakości i bezpieczeństwa pokarmu kobiecego w tym kontekście nabiera dodatkowego znaczenia, gdyż biorcami mleka z banku mleka jest grupa bardzo wrażliwych pacjentów - noworodki urodzone przedwcześnie, wymagające długiego leczenia. Rutynowe procedury rekrutacji dawczyń do banku mleka kobiecego obejmują wprawdzie wywiad epidemiologiczny oraz analizę warunków i stylu życia, ale nie przeprowadza się rutynowo pogłębionego wywiadu żywieniowego.

W przedstawionej pracy zastosowano natomiast wobec wszystkich uczestniczek autorski kwestionariusz ankiety w którym uwzględnione zostały pokarmy i produkty lub ich składowe, które potencjalnie mogą być zanieczyszczone przez mikotoksyny. Dzięki temu było możliwe określenie korelacji występowania ochratoksyny A w moczu, surowicy krwi i mleku z dietą stosowaną przez uczestniczki, co obok określenia częstości i zawartości obu badanych mikotoksyn w płynach ustrojowych, postawiono za główny cel pracy. Nawiązana współpraca z Regionalnym Bankiem Mleka w Toruniu pozwoliła na realizację celi szczegółowych takich jak ocena wpływu na zawartość toksyn w mleku czystości mikrobiologicznej pokarmu, zbadanie efektu pasteryzacji oraz czynników matczyńskich (sposób żywienia dziecka, cechy demograficzne). Nadaje to wynikom pracy dodatkowy walor praktyczny.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 93 strony (pomijając strony zawierające podziękowania, spis treści, spisy rysunków, wykresów, zdjęć oraz bibliografię). Rozprawa ma układ typowy dla prac doświadczalnych. Rozpoczyna się kilkustronicowym wstępem, po którym w kolejnych dwóch rozdziałach szczegółowo opisano charakterystykę chemiczną i występowanie badanych związków w żywności, jak również sposoby wyliczenia dawek spożycia tych toksyn wraz z pożywieniem, oraz normy spożycia. Opisano też mechanizm działania OTA i ZEN, toksokinetykę oraz toksyczność dla ludzi i zwierząt wraz z etiologią i obrazem klinicznym wywoływanych chorób. Krótki, aczkolwiek bardzo ważny, rozdział poświęcono aktualnym technikom analitycznym umożliwiającym wykrywanie mikotoksyn w żywności. Osobne dwa rozdziały dotyczą charakterystyki mleka kobiecego w kontekście składu odżywczego oraz korzyści prozdrowotnych wynikających z karmienia piersią (rozdział 6) oraz działalności banków mleka (rozdział 7). Kolejny rozdział, poprzedzający sformułowany cel badań, poświęcono omówieniu stanu wiedzy dotyczącego

bezpieczeństwa mleka, w tym pokarmu kobiecego, pod kątem zanieczyszczenia ochratoksyną A oraz aflatoksyną M1. Następny rozdział rozprawy pt. Materiał badawczy i metody zawiera wykaz odczynników i sprzętu oraz opis metod oznaczania badanych związków. Opisano też dokładnie sposób pobierania i przechowywania materiału biologicznego użytego do oznaczeń, z wyjątkiem metod pobierania i przechowywania mleka kobiecego które zostały potraktowane bardzo skrótowo. Ta część pracy została bogato zilustrowana 20 zdjęciami dającymi pogląd użytego sprzętu laboratoryjnego, zawiera też tabelę z wartościami LOD oraz LOQ i odzysku oznaczanych związków w płynach ustrojowych. W opisie metodyki pracy zawarto też istotną informację o pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy w związku prowadzonym badaniem co jest kluczowe ze względu na jego charakter i udział matek małych dzieci karmiących piersią.

Wyniki pracy przedstawiono na 33 stronach w przejrzysty sposób ułatwiający czytelnikowi ich interpretację. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla poszczególnych zmiennych niezależnych takich jak częstości spożycia produktów czy czynniki matczyne zebrano w kilku odrębnych tabelach. Wyniki przeprowadzonych analiz regresji liniowej za pomocą utworzonych modeli zilustrowano korelogramami zbiorczymi zmiennych oraz wykresami ilustrującymi tylko poszczególne zależności. W toku dyskusji otrzymane wyniki autorka zestawiała do dostępnych danych literaturowych podkreślając pewne ograniczenia związane z brakiem innych badań porównujących zależność występowania toksycznych związków w płynach ustrojowych kobiet w okresie laktacji od czynników matczynych i demograficznych. Wskazano też na brak danych eksperymentalnych dotyczących wpływu procedur i wytycznych stosowanych w bankach mleka na zawartość mikotoksyn (pasteryzacja, czystość mikrobiologiczna). Można to jednak potraktować jako dowód unikatowości recenzowanej pracy. Rozprawę kończą poprawnie sformułowane wnioski.

Istotne i oryginalne elementy Rozprawy

Do istotnych elementów badania decydujących o jego dużej wartości naukowej i praktycznej zaliczam:

1. Szeroki zakres badania pod kątem analizy zawartości ochratoksyny A w trzech rodzajach płynów ustrojowych takich jak mocz, surowica krwi oraz mleko kobiece oraz zearalenonu i jego metabolitów w moczu.
2. Wykorzystanie potencjału analitycznego oraz zaplecza klinicznego banku mleka kobiecego do uzupełnienia badania o charakterze biomonitoringu mleka o nowe dane które potencjalnie mogą mieć znaczenie dla wystąpienia biomarkerów.
3. Wykorzystanie kwestionariusza ankiety pozwalającego ocenić częstość spożycia pokarmów które mogą być źródłem badanych zanieczyszczeń

Uwagi krytyczne

W części teoretycznej rozprawy autorka pisząc o korzyściach karmienia piersią przytacza wiele badań potwierdzających korzyści zdrowotne żywienia naturalnego wcześniaków które są bardzo szczególną grupą noworodków. Wśród cytowanych w rozdziale 6 publikacji dotyczących mleka kobiecego wiele dotyczy żywienia pasteryzowanym mlekiem z banku mleka, którego działania nie powinno się zrównywać do efektów związanych z kamieniem mlekiem wprost z piersi. Duża część przywołanych w tym fragmencie publikacji ma charakter opinii eksperckich lub przeglądów literatury. Tymczasem pominięto publikacje o charakterze przeglądów systematycznych i metaanaliz z wielośrodkowych badań populacyjnych które stoją najwyżej w hierarchii dowodów naukowych. To na ich podstawie formułowane są zalecenia dotyczące interwencji w obszarze zdrowia publicznego, w tym karmienia piersią. Pewnym niedociągnięciem pracy jest brak informacji o liczebności populacji przewidzianej do udziału w badaniu wraz ze wskazaniem ilu uczestnikom zaproponowano udział, ale nie wyraziły one zgody. Biorąc pod uwagę wyniki prac innych autorów wskazujące na stosunkowo rzadkie występowanie badanych zanieczyszczeń w mleku kobiecym, źle dobrana próba badana nie pozwoliłaby zbadać założonych zależności. Dużym ułatwieniem dla czytelnika byłby też diagram ilustrujący przebieg rekrutacji pacjentek, na którym można by łatwo podsumować, ile próbek i jakiego rodzaju poddano ostatecznie analizie i w ilu przypadkach materiał i dokumentacja pozyskana od uczestniczek była kompletna (próbka moczu, krwi i mleka oraz ankieta dotycząca diety).

Badana populacja wydaje się być dość niejednorodna - dawczynie pokarmu kobiecego które stanowią 34% grupy badanej to, specyficzna pod wieloma względami grupa kobiet, która może znacznie różnić się zwyczajami żywieniowymi jak również praktykami karmienia piersią od pozostałych uczestniczek badania. Szczególnie w kontekście analizy mleka może mieć znaczenie, to że dawczynie mleka to kobiety, które rutynowo odciągają mleko do banku, wobec tego dobrze znają zarówno techniki odciągania pokarmu jak i zasady higieny i sposób postępowania z odciągniętym mlekiem. Brakuje informacji czy jakieś wytyczne w tej kwestii przekazano pozostałym pacjentom.

Jednocześnie chciałam pokreślić, że zarówno eksperymentalne metody analityczne, jak i diagnostyczne metody identyfikacji bakterii oraz badania składu mleka stosowane rutynowo w banku mleka, zostały prawidłowo dobrane do osiągnięcia założonych celów naukowych.

W pracy nie znalazłam też szczegółowych informacji o ustalonym protokole zbierania mleka który definiowałby nie tylko objętość próbki, ale także etap laktacji w którym prowadzona jest zbiórka oraz pory dnia w której próbka została odciągnięta. Nie określono, czy mleko było pobierane ręką czy też za pomocą laktatora (elektrycznego czy ręcznego), czy było od razu mrożone po pobraniu, i czy było przechowywane w domowych zamrażarkach przed przekazaniem do badań, jakie były warunki transportu próbek do docelowych laboratoriów, gdzie odbywały się poszczególne oznaczenia, z jakiej pory dnia pochodziło mleko do badań. Wszystkie te szczegóły mogą mieć wpływ na uzyskane wyniki, szczególnie te odnoszące się do mleka. Brak powtarzalnych schematów zbierania materiału jest jedną z głównych przeszkód w porównaniu otrzymanych wyników pomiędzy badaniami i utrudnia sformułowanie bardziej ogólnych wniosków na temat bezpieczeństwa mleka. Ma to szczególnie znaczenie w kontekście wiedzy, o tym że np. stosunek stężenia ochratoksyny A w mleku do stężenia w surowicy (ratio M/P) jest różny w zależności od etapu laktacji i objętości mleka. Szkoda, że autorka nie podjęła analizy tego wskaźnika w przypadku próbek mleka w których wykryto zanieczyszczenia OTA w mleku, i w surowicy, i nie odniosła wyników do fazy laktacji z której pochodziła próbka (w ankiecie dla uczestniczek znajduje się pytanie o aktualny wiek dziecka który pozwala wyliczyć tydzień laktacji). Najistotniejsze jednak oczywiście byłoby ocena narażenia dzieci na spożycie mikotoksyn wraz z mlekiem matki, to jednak wymagałoby informacji o objętości

spożywanego przez dziecko pokarmu w czasie, kiedy pokarm oddawany był do analizy. W pracy wykazano wpływ rodzaju i częstotliwości spożycia wybranych produktów spożywczych, na zawartość ochratoksyny A w moczu i surowicy krwi ale zaobserwowane korelacje były słabe lub umiarkowane. W kolejnych badaniach należałoby może użyć zwalidowanego kwestionariusza częstotliwości spożycia pokarmów FFQ (ang. Food Frequency Questionnaires) który umożliwi wykrycie również nieoczywistych zależności.

Podejmując tak ważne z punktu widzenia zdrowia publicznego tematy jak biomonitoring z wykorzystaniem płynów ustrojowych kobiet w okresie okołoporodowym, zawsze trzeba mieć też na względzie dobro matki i karmionego piersią dziecka. Przedstawiona do recenzji praca z pewnością jest punktem wyjścia do szerszej dyskusji na ten temat. Zastanawia więc w jaki sposób i czy w ogóle, przekazano informacje o wynikach uczestniczkom badania w przypadku wykrycia zanieczyszczenia OTA w mleku.

Uwagi redakcyjne

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie i estetycznie pod kątem składu tekstu, z wykorzystaniem kolorowych zdjęć i schematów. Natknęłam się na kilka drobnych błędów i niezręczności stylistycznych jak np. „ prowadzona dieta” , „najpopularniejsze kwasy” które nie mają wpływu na merytoryczną ocenę pracy. Na schemacie nr 7 ilustrującym narażenie matek i noworodków na żywność skażoną mikotoksynami znajduje się informacja, która może sugerować, że transfer laktacyjny dotyczy przenikania toksyn z moczu do mleka, co wprowadza czytelnika w błąd.

Wnioski końcowe

Pani Karolina Ropejko wykazała się szeroką wiedzą z zakresu planowania i przeprowadzenia badań z wykorzystaniem próbek pochodzących od szczególnej grupy uczestniczek jaką są kobiety w okresie laktacji. Sposób prezentacji wyników dowodzi także że posiadała umiejętność opracowania bogatego materiału biologicznego i statystycznej analizy danych. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne są raczej zachętą do dyskusji na temat bezpieczeństwa mleka kobiecego i nowych wyzwań związanych z promocją karmienia piersią, i w niewielkim stopniu obniżają bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy.

Stwierdzam, że rozprawa p.t.: „ **Ochrotoksyna A w mleku, moczu i surowicy krwi ora zearalenon w moczu kobiet będących w okresie laktacji** „, spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnoszę więc o dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach przewodu doktorskiego Pani mgr Karoliny Ropejko.

Podpis



dr hab. Aleksandra Wesolowska