



Warszawa, 16.10.2023 r.

Dr hab. n. o zdr. Barbara Baranowska, prof. CMKP  
Zakład Położnictwa CMKP  
Ul. Żelazna 90  
01-004 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Katarzyny Łubiech  
pt. „Bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym”**

**Uniwersytet Kazimierza Wielkiego**

**Wydział Nauk Biologicznych**

**w Bydgoszczy**

**Promotor: dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni**

**Promotor Pomocniczy: dr n. med. Elena Sinkiewicz-Darol**

Mikrobiom nowonarodzonego dziecka kształtuje się już w okresie prenatalnym. Badania prowadzone w ostatnich latach potwierdzają kluczową rolę kolonizacji poporodowej i jej wpływu na dalsze życie dziecka. Na skład, różnorodność mikrobioty wpływ ma wiele czynników, między innymi miejsce i droga porodu, antybiotykoterapia w okresie perinatalnym czy sposób żywienia noworodka. Ogólna liczba mikroorganizmów w mleku kobiecym jest zróżnicowana i zależy od wielu czynników, zarówno matczynych, jak i środowiskowych. Mikrobiom dzieci karmionych naturalnie i karmionych pokarmem sztucznym różni się, na korzyść pokarmu matczynego i stymuluje środowisko naukowe do eksploracji tego zagadnienia. W mleku matki znajdują się bakterie rodzaju *Lactobacillaceae* których korzystny, prozdrowotny wpływ na stan zdrowia rozwijającego się dziecka został odnotowany w badaniach. Mleko kobiece uznawane jest za aktywną biologicznie substancję, a karmienie mlekiem kobiecym za optymalny sposób nie tylko żywienia, ale również zapewnienia dziecku osłony immunologicznej. Karmienie naturalne wiąże się z



licznym długo i krótkoterminowymi korzyściami dla matek, dzieci i społeczeństwa. Identyfikacja czynników warunkujących prawidłowy przebieg laktacji oraz czynników wpływających na odpowiedni skład mleka kobiecego wciąż stanowi temat badań. Rozwijająca się dziedzina - nauka o laktacji pokazuje zapotrzebowanie na pogłębienie badań w tym zakresie. W świetle pojawiających się nowych doniesień dotyczących składu (w tym zawartości drobnoustrojów) i właściwości pokarmu, praca podjęta przez lek. wet. Katarzynę Łubiech wydaje się jak najbardziej zasadna i celowa. Wyniki pracy dostarczają nowych informacji mogących dostarczyć implikacji klinicznych. Badanie przeprowadzone przez Doktorantkę wpisuje się w dyskusję toczącą się w tym obszarze w piśmiennictwie naukowym.

Celem pracy była dostarczenie wiedzy na temat występowania bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w populacji polskich kobiet karmiących piersią. Dodatkowym aspektem pracy było określenie właściwości bakterii należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego oraz możliwości ich praktycznego wykorzystania. Doktorantka analizuje w pracy częstości występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym, w populacji polskich kobiet karmiących piersią oraz charakteryzuje czynniki środowiskowe oraz matczyne mogące mieć wpływ na jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

### **Charakterystyka i ocena formalna rozprawy doktorskiej**

Układ pracy typowy dla dysertacji w obszarze nauk ścisłych i przyrodniczych, liczy 172 strony i podzielony jest na 9 rozdziałów. Praca dodatkowo zawiera wykaz stosowanych skrótów oraz symboli, spis tabel, spis wykresów, spis rysunków, spis zdjęć, załączniki i bibliografię. W pracy umieszczono 13 tabeli, 36 wykresów, 10 rysunków, 9 zdjęć oraz 218 pozycji piśmiennictwa. Praca prezentuje staranną szatę edycyjną, jest napisana zgodnie z regułami języka polskiego. Błędy stylistyczne, interpunkcyjne i edytorskie są bardzo rzadkie. Na przeprowadzenie badań Doktoranta uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej



Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o numerze KB921/2018.

## **Charakterystyka i ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Rozbudowany rozdział „Wstęp”, podzielony na podrozdziały zawiera informacje dotyczące wybranych właściwości karmienia piersią i żywienia mlekiem kobiecym, charakterystykę mikroflory mleka kobiecego oraz bakterii należące do rodziny *Lactobacillaceae*. Doktorantka w tej części pracy poświęciła uwagę również charakterystyce oligosacharydów mleka kobiecego i mikrobiomu dziecka. Ta część teoretyczna pracy prowadzi w logiczny sposób do zdefiniowania założeń i celu badań przedstawionych w kolejnym rozdziale. Proporcje dotyczące opisywania poszczególnych elementów teorii zostały właściwie zachowane. Systematyczność i przejrzystość w opracowaniu treści części teoretycznej wynika z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Wstęp oparty jest na właściwie dobranym piśmiennictwie, uwzględniającym znaczący udział obcojęzycznych pozycji naukowych związanych z tematem dysertacji.

Podsumowując, lek. wet. Katarzyna Łubiech prezentując obecny stan wiedzy, uzasadniła potrzebę podjęcia przedstawionej wyżej tematyki badawczej, a praca spełnia wymagane w tym zakresie od rozpraw doktorskich kryteria istotności i poprawności rzeczowej.

Właściwie i rzetelnie przedstawione rozdziały „Cel pracy; Materiały; Aparatura i wyposażenie; Metody Badawcze” wskazują na logicznie zaplanowanie działań badawczych, a założenia i cele pracy zostały jasno i precyzyjnie określone. Doktorantka szczegółowo przedstawia przebieg rekrutacji, badania, uzasadnia wybór grup badanej oraz kryteria włączenia i wyłączenia matek do badania. Materiał badawczy stanowiły 63 próbki mleka kobiecego pobrane od 63 kobiet karmiących piersią, które wyraziły chęć udziału w badaniu. Przedmiotem poszczególnych badań były próbki mleka kobiecego pozyskane na pierwszym etapie oraz izolaty bakterii należące do *Lactobacillaceae* wyizolowane z próbek mleka kobiecego.

W badaniach dotyczących składu mleka kobiecego Doktorantka przebadła łącznie 56



próbek (w tym 14 dodatnich pod kątem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*), analizie oligosacharydów występujących w składzie mleka kobiecego poddała 44 próbki (w tym 10 dodatnich pod kątem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*). Badania skoncentrowane na właściwościach szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae* przeprowadziła na 10 z 15 szczepów należących do *Lactobacillaceae* zidentyfikowanych w przebadanych próbkach mleka kobiecego. Porcje mleka, pochodzące od dawczyń mleka kobiecego (pochodzące z Banku Mleka Kobiecego w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. L. Rydygiera w Toruniu), stanowiły środowisko dla szczepów bakteryjnych poddawanych badaniu przeżywalności w czasie przechowywania w warunkach obniżonej temperatury.

Doktorantka szczegółowo opisuje aparaturę, wyposażenie, odczynniki mikrobiologiczne, do identyfikacji molekularnej oraz odczynniki i materiały do badania cytotoxyczności i oligosacharydów.

W pierwszym etapie Doktorantka oceniała skład mikrobiologiczny mleka kobiecego. W następnym etapie kolonie potencjalnie należące do *Lactobacillaceae* identyfikowała za pomocą takich metod, jak ocena właściwości morfologicznych i biochemicznych, identyfikacja z zastosowaniem techniki MALDI-IVD oraz metod molekularnych (PCR). W kolejnym kroku przeprowadziła badania dotyczące właściwości szczepów, wyizolowanych ze środowiska mleka kobiecego, bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Następnie określała przeżywalność bakterii w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego, przechowywanego w obniżonej temperaturze, wpływ metabolitów bakterii należących do *Lactobacillaceae* na komórki nowotworowe linii MCF-7 oraz wrażliwość omawianych drobnoustrojów względem antybiotyków. Probki mleka kobiecego poddała w następnej kolejności analizie w celu scharakteryzowania zawartych w nich oligosacharydów oraz analizie składu pod względem makroskładników.

Do opisu charakterystyki badanej populacji oraz poznania czynników mogących oddziaływać na skład mikrobiologiczny mleka kobiecego doktorantka przeprowadziła badanie ankietowe.

W badaniu wykorzystowała analizator składu mleka kobiecego MIRIS HMA (Miris AB, Uppsala, Szwecja). Analizy wykonała we współpracy z Bankiem Mleka Kobiecego w



Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. L. Rydygiera w Toruniu.

Ilościowe oznaczanie ogólnej liczby mezofilnych bakterii tlenowych w próbkach mleka kobiecego przeprowadziła z wykorzystaniem agaru mlecznego (Merck). Badany materiał posiewała metodą posiewu wgłębnego po wykonaniu szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Badanie przeprowadziła w dwóch powtórzeniach. Równocześnie wykonywała posiew powierzchniowy na podłoże dla ogólnej liczby mezofilnych drobnoustrojów tlenowych w celu identyfikacji mikroorganizmów zawartych w badanej próbce mleka kobiecego. Wyrosłe kolonie analizowała następnie przy użyciu spektrometrii mas z wykorzystaniem urządzenia MALDI Biotyper (Bruker).

W celu wykrycia obecności oraz wyizolowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* Doktorantka wykorzystwała posiew na podłoże stałe De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) oraz jego modyfikacje. Inkubację prowadziła w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych przez 72±2 godziny.

Wyrosłe kolonie bakteryjne kwalifikowała jako potencjalnie przynależne do *Lactobacillaceae* na podstawie cech morfologicznych, takich jak wielkość, kształt, brzeg, powierzchnia, barwa, przejrzystość. Kolonie zakwalifikowane do dalszej analizy poddawała identyfikacji metodą spektrofotometrii mas przy użyciu urządzenia MALDI Biotyper IVD (Bruker). Dodatkowym etapem identyfikacji wyizolowanych szczepów było zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Analiza uzyskanych amplikonów została przeprowadzona z zastosowaniem rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym w buforze 1xTBE (EURx) wybarwionym Midori green umożliwiającym wizualizację w świetle UV.

Przynależność do badanych drobnoustrojów do grupy bakterii Gram-dodatnich potwierdziła Doktorantka, wykonując barwienie Grama. W ocenie właściwości biochemicznych badanych drobnoustrojów analizowała zdolność wyizolowanych drobnoustrojów do wytwarzania katalazy. W badaniu tym zastosowała 3% roztwór nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych szczepów bakteryjnych przeprowadziła z zastosowaniem metody dyfuzji krążkowej (Ampicylina, Wankomycyna,



Gentamycyna, Kanamycyna, Erytromycyna, Tetracyklina). Test wrażliwości na antybiotyki wykonała z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów paskowych (E-TEST, bioMerieux), których istotą działania jest wskazanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) określonego chemioterapeutyku wpływającego na badany szczep bakteryjny.

W badaniu oceniła również cytotoksyczność metabolitów postbiotycznych, zawartych w supernatancie pochodzącym z hodowli szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z próbek mleka kobiecego, względem komórek nowotworowych MCF-7. Cytotoksyczność określona została na podstawie przeprowadzonych testów MTT.

Porcje mleka kobiecego poddanego pasteryzacji (próbki mleka kobiecego pozyskane z banku mleka kobiecego), o objętości 20 mL, zaszczepiała doktornatka bakteriami należącymi do *Lactobacillaceae*, uzyskanymi na wcześniejszym etapie badań. Kolejnym etapem badań był podział zaszczepionych bakteriami porcji mleka na mniejsze objętości (2,5 mL) i umieszczenie ich w określonych warunkach temperaturowych (4°C dla badania w warunkach chłodniczych oraz -20°C dla przechowywania w warunkach zamrażalniczych).

Badanie zawartości oligosacharydów w próbkach mleka kobiecego zostało wykonane we współpracy z dr hab. inż. Dorotą Martysiak-Żurowską oraz dr hab. inż. Barbarą Kusznierevicz z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej. Zawartość oligosacharydów w próbkach mleka kobiecego zbadana została zgodnie z metodą opisaną przez Remoroza i wsp. (2018) oraz Jarzynka i wsp. (2022).

W analizie statystycznej Doktorantka zastosowała jednoczynnikowe analizy wpływu wielu zmiennych na zmienną dwustanową za pomocą metody regresji logistycznej. Wyniki przedstawiła w postaci wartości parametrów OR z 95-procentowym przedziałem ufności. W analizie przyjęła poziom istotności 0,05. Analizę wykonała w programie R, wersja 4.2.2.

Reasumując, zarówno zastosowana metodyka badań oraz wykorzystane metody i narzędzia analizy statystycznej spełniają kryteria poprawności warsztatu naukowego oraz



pozwoliły Doktorantce we właściwy sposób zrealizować założone cele badawcze.

Następnie, na 42 stronach wyniki badań zostały przedstawione opisowo, uzupełnione tabelami oraz rycinami, co ułatwia przekaz i odbiór treści. Doktorantka zaobserwowała, że wśród kobiet, w których mleku zidentyfikowano bakterie *Lactobacillaceae*, częściej dochodziło do porodu drogą cięcia cesarskiego (35,7%). Kobiety te częściej karmiły dzieci w tandemie (karmienie piersią zarówno młodszego, jak i starszego dziecka), a większa ich liczba mieszkała na obszarach wiejskich. Dodatkowo rzadziej przyjmowały antybiotyki w czasie ciąży, dokarmiały mlekiem modyfikowanym dzieci i częściej przyjmowały probiotyki zarówno w czasie ciąży, jak i trwania laktacji. Składem mleka pod względem makroskładników był podobny w obu badanych grupach. Doktorantka opisała wzrastającą, wraz z postępem laktacji, zawartość tłuszczu oraz suchej masy w mleku kobiecym, a także zwiększającą się wartość energetyczną. W populacji przebadanych próbek zaobserwowała tendencję spadkową zawartości białka całkowitego oraz odżywczego, trwającą między 6 a 24 miesiącem laktacji. U kobiet karmiących ponad dwa lata zawartość białka w składzie mleka kobiecego znacząco wzrosła i przekroczyła wartość początkową obserwowaną w pierwszym półroczu laktacji. Zawartość tłuszczu, suchej masy oraz wartość energetyczna były istotnie wyższe po 25 mies. niż w 1.–6., 7.–12. i 13.–28. mies. Wyniki badań mikrobiologicznych wykazały, że średnia zawartość bakterii w badanych próbkach wyniosła  $4,4 \times 10^4$  jtk/mL. Wyniki analizy MALDI wykazały, że dominującym mikroorganizmem obecnym w mleku kobiecym był *Staphylococcus epidermidis*, izolowany z 80,95% badanych próbek mleka kobiecego. Wśród zidentyfikowanych przez Doktorantkę drobnoustrojów często pojawiały się również bakterie z rodzaju *Streptococcus* (*S.mitis*, *S.oralis*, *S.vestibularis*, *S.parasanguinis*, *S.pneumoniae*). Przeprowadzone badania wykazały obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* w 22,2% badanych próbek mleka kobiecego. W próbkach, w których wykryto obecność badanych bakterii, występował zwykle tylko jeden rodzaj (93,3%). W jednej z przebadanych próbek Doktorantka zidentyfikowała dwa rodzaje bakterii należące do *Lactobacillaceae*. Najczęściej izolowanym szczepem bakterii należącym do *Lactobacillaceae* był *L. gasseri* (46,60%). Badane szczepy, pozyskane ze środowiska mleka kobiecego, wykazywały zróżnicowaną wrażliwość względem poszczególnych antybiotyków. Cytotoksyczność metabolitów postbiotycznych



badanych szczepów bakteryjnych zależna była od czasu oddziaływania na komórki nowotworowe, jak i od zastosowanego stężenia. Po upływie 24 godzin nie odnotowano działania cytotoksycznego względem komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki wskazują na zdolność bakterii należących do *Lactobacillaceae* do przeżywania w warunkach obniżonej temperatury, w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, zarówno przechowywanie chłodnicze, jak i zamrażalnicze łączy się z obniżaniem ilości żywych komórek bakteryjnych, jednak szybkość obniżania przeżywalności nie jest intensywna. W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka zidentyfikowała 20 rodzajów oligosacharydów. Nie wykazała różnic istotnych statycznie pod względem czynników matczynych badanych w obu grupach próbek różniących się obecnością bakterii należących do *Lactobacillaceae*.

W dalszej części pracy, następuje sprawnie poprowadzona dyskusja wyników na tle badań już opublikowanych.

W podsumowaniu analizy uzyskanych wyników badań Autorka sformułowała 8 wniosków szczegółowych wynikających z badań:

1. Mleko kobiece może być źródłem bakterii o charakterze probiotycznym należących do *Lactobacillaceae*.
2. Bakterie należące do *Lactobacillaceae* nie występują w mleku kobiecym wszystkich kobiet karmiących piersią.
3. Bakterie należące do *Lactobacillaceae* występują w mleku kobiecym najczęściej pojedynczo (tylko jeden rodzaj i gatunek).
4. Postbiotyczne metabolity wytwarzane przez bakterie należące do *Lactobacillaceae* wywierają selektywne działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych MCF-7.
5. Bakterie należące do *Lactobacillaceae* charakteryzują się wysoką przeżywalnością w pasteryzowanym mleku kobiecym przechowywanym w warunkach chłodniczych oraz zamrażalniczych.
6. Bakterie należące do *Lactobacillaceae* wykazują zróżnicowaną wrażliwość względem antybiotyków.





7. Obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* skorelowana jest z wyższą zawartością HMO w składzie mleka kobiecego.
8. Obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* skorelowana jest z wyższą zawartością oligosacharydu 2'-FL.

Lista piśmiennictwa zawiera 218 opisów bibliograficznych. Autorka zastosowała sposób sporządzania bibliografii załącznikowej według kolejności alfabetycznej.

Reasumując recenzowana rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem, którego niewątpliwym osiągnięciem jest rozbudowana metodologia pracy uwzględniająca wiele czynników i analiz. Dodatkowo, potwierdzenie wartości mleka kobiecego wraz z długością laktacji przyczynia się do promowania karmienia piersią dzieci powyżej roku. Doceniam trafny wybór tematu, uwzględniający ważność problematyki badawczej, dający szansę na praktyczne rozwiązania zarówno w obszarze wzbogacania sposobu żywienia niemowląt i dzieci, ale także wykorzystania w zakresie suplementacji wspomagającej terapię chorób o charakterze nowotworowym. Wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają znaczący wkład w rozwój nauki o laktacji i opisie fenomenu mleka kobiecego.

Opierając się na całościowej ocenie - stwierdzam, że lek. wet. Katarzyna Łubiech, wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy naukowej, właściwym doбором metod i narzędzi badawczych, także rzetelnym i sumiennym podejściem do otrzymanych wyników, jak również niezbędnym w pracy naukowej krytycznym i zwięzłym spojrzeniem na otrzymane wyniki i twórczą dyskusją. W mojej opinii oceniana praca spełnia wymagane od rozpraw doktorskich kryteria istotności i poprawności rzeczowej.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej lek. wet. Katarzyny Łubiech nasuwają się też pewne uwagi:

Brak odpowiedniej wielkości grupy badanej (w tej sytuacji liczby próbek mleka posiadających w składzie bakterie należące do *Lactobacillaceae*) ogranicza możliwości formułowania wniosków. Dodatkowo wnioski zawarte w pracy, stanowią raczej uogólnione wyniki. W odniesieniu do narzędzia badawczego rozróżniłabym „drogę” i „siły”



porodu, zgodnie z czym poród indukowany oksytocyną przestaje być porodem siłami natury (a jest siłami oksytocyny), a może być już jedynie porodem drogami natury. W odniesieniu do masy ciała kobiet nie należy używać słowa „waga”, i uważam, że dla wszystkich badanych określenie „masa ciała” jest nadal zrozumiałe.

Na uwagę zasługuje modyfikacja użycia założonego wcześniej podłoża w przypadku oznaczenie wrażliwości na antybiotyki, wskazująca na elastyczne i twórcze podejście doktorantki do prowadzenia badania.

Drobne błędy (Str. 22, brakuje przecinków w przypadku wymieniania poszczególnych elementów, str. 27 brak przecinka po „i wsp.”, str. 29 brak spacji w przypisie). Sugerowałabym ujednoczenie pozycji piśmiennictwa poprzez usunięcie dodatkowych, wykazanych jedynie w nielicznych pozycjach danych (dni i miesiące publikacji, Epub i PMID)

Niniejsze uwagi, mają jednak charakter marginalny i nie umniejszają wartości rozprawy.



## Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani lek. wet. Katarzyny Łubiech zatytułowana „Bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi stawiane rozprawom naukowym zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), jak również art. 187 Ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. Zm.). W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Katarzyny Łubiech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Zakładu Położnictwa  
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego  
*Barbara Baranowska*  
dr hab. n. o zdr. Barbara Baranowska, prof. CMKP