

Warszawa, 20 maja 2019 r.

Dr hab. Jarosław Woliński, prof. IFiZZ PAN
Zakład Fizjologii Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego*
Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Olgi Barbarskiej pt. „Optymalizacja składu mleka kobiecego przeznaczonego dla noworodka przedwcześnie urodzonego” (Optimization of the human milk composition intended for the prematurely born infant) wykonanej pod kierunkiem Promotora dr hab. n. o zdr. Gabrieli Olędzkiej oraz Promotora pomocniczego dr n. biol. Aleksandry Wesołowskiej. Pracę wykonano w Uniwersyteckiej Pracowni Badań nad Mlekiem Kobiecym i Laktacją przy Regionalnym Banku Mleka w Szpitalu Specjalistycznym im. Św. Rodziny, Kliniki Neonatologii WNoZ WUM.

Do ssaków należą zarówno największe, jak i jedne z najmniejszych zwierząt świata, a także człowiek. Największe – wieloryby-pletwał błękitny (*Balaenoptera musculus*) osiąga masę 150 ton i długość do 30 metrów. Najmniejszym zaś ssakiem jest ryjówka etruska (*Suncus etruscus*), która waży zaledwie 1,5 grama. Gdzieś pomiędzy tymi dwoma gatunkami plasuje się pozostałe 4,5 tysiąca (około) gatunków ssaków w tym noworodek ludzki. Pomimo wielu ogromnych różnic fenotypowych mają one pewne cechy wspólne niezależnie od masy ciała i jego rozmiarów. Najważniejszą cechą wspólną z punktu widzenia fizjologii jest posiadanie gruczołu mlekowego. Gruczoł ten ewolucyjnie pochodzi od gruczołów potowych. Zazwyczaj parzyste gruczoły mleczne są gruczołami skórnymi. Tworzą pola gruczołowe u stekowców, u pozostałych ssaków tworzą sutki (*mamma*). Są też różnie zlokalizowane: na piersi (ludzie, nietoperze, małpy), w jamie pachwinowej (ssaki kopytne) oraz na brzuchu. Liczba sutek jest różna i charakterystyczna dla poszczególnych gatunków. Są to gruczoły, które produkują siarę i mleko, które z kolei stanowi pierwszy i jedyny (w charakterystycznym dla każdego gatunku okresie) pokarm każdego nowo narodzonego ssaka.

Pokarm, który stanowi gwarancję przeżycia i prawidłowego rozwoju całego organizmu, produkowany jest wyłącznie przez organizm matki. Rola matki nie kończy się jednak tylko na produkcji mleka. To właśnie one dzięki wysoce rozwiniętym instyktom wiedzą, kiedy i z jaką częstotliwością powinny karmić swoje potomstwo. Ilość pokarmu, którą otrzymuje nowo narodzony ssak oraz częstotliwość posiłków zależy przede wszystkim od składu jakościowego siary i mleka produkowanego przez gruczoł mlekowy. Zasadniczo skład chemiczny siary i mleka jest taki sam dla wszystkich ssaków, jednak proporcje pomiędzy poszczególnymi jego składnikami są charakterystyczne dla danego gatunku. Jednak pierwszym pokarmem każdego ssaka jest siara-wydzielina gruczołu mlekowego, która jest produkowana w zależności od gatunku od kilku mililitrów (człowiek) do kilku litrów (do 4 dni po porodzie-krowa). Skład siary różni się istotnie od składu mleka, głównie w proporcjach komponentów białkowych oraz tłuszczowych jednak z punktu widzenia każdego ssaka najważniejszą komponentą siary są immunoglobuliny, które w zależności od gatunku (budowy łożyska) wzmacniają jego odporność lub też w ogóle decydują o jego przeżyciu. Siara oprócz składników pokarmowych w swoim składzie posiada również szereg substancji poza odżywczych. Do najważniejszych z nich należą: hormony, peptydy regulacyjne, czynniki wzrostu oraz czynniki antybakteryjne. W zależności od gatunku w kolejnych godzinach, dniach laktacji mówimy już o produkcji mleka, które podobnie jak siara jest bogate w substancje poza odżywcze.

Z punktu widzenia prowadzonych od blisko 20 lat badań własnych, najważniejszą komponentą siary i mleka ssaków są jego hormony oraz bioaktywne peptydy, które mogą być również definiowane jako czynniki wzrostowe. Większość najnowszych opracowań dotyczących bioaktywnych peptydów mleka dzieli je na peptydy o właściwościach: przeciwzapalnych, antybakteryjnych, antyoksydacyjnych, regulujących masę ciała, poziom insuliny i glukozy, wpływających na syntezę białek mięśni oraz o właściwościach immunomodulacyjnych. Z punktu widzenia fizjologii procesu rozwoju przewodu



pokarmowego brak jest w tych opracowaniach grupy peptydów/hormonów, które są syntetyzowane *de novo* w gruczole mlekowym ssaków lub przechodzą bezpośrednio z krwi do siary i mleka, a następnie zachowując swoją aktywność biologiczną trafiają do przewodu pokarmowego nowo narodzonego ssaka. To właśnie te peptydy (między innymi badana przez Doktorantkę leptyna) w ocenie recenzenta odgrywają wysoce istotną rolę w procesie wzrostu oraz dojrzewania strukturalnego i funkcjonalnego przewodu pokarmowego wcześniaka, oraz noworodka ludzkiego, a także całego organizmu. Siara i mleko z uwagi na zawarte w nich biologicznie aktywne składniki mają za zadanie dostarczyć rozwijającemu się wcześniakowi i noworodkowi nie tylko energii i niezbędnych składników pokarmowych, ale także sterować rozwojem organizmu młodego ssaka, a w szczególności rozwojem przewodu pokarmowego.

Badania ostatnich 30 lat dowodzą, że lokalne systemy regulujące funkcjonowanie przewodu pokarmowego noworodka: układ endokryny żołądka i jelit oraz jelitowy układ nerwowy są tylko częściowo rozwinięte w chwili porodu. Ich dalszy rozwój odbywa się w pierwszych dniach po urodzeniu i podlega kontroli bioaktywnych peptydów dostarczanych z siarą i mlekiem matki. Postnatalny rozwój błony śluzowej żołądka i jelit odbywa się etapowo. Zostaje zapoczątkowany odżywianiem *per os* i kontynuowany jest po odsadzeniu od matki i przejściu na pokarm stały. W kilku pierwszych dniach życia przyrost masy jelita cienkiego znacznie przewyższa wzrost innych narządów, dotyczy to głównie błony śluzowej jelita cienkiego. Ten pierwszy etap zależy od jakości mleka i rzutuje w istotny sposób na dalszy rozwój osobniczy oraz zdrowotność noworodka, a zwłaszcza wcześniaka. W badaniach własnych wykazano, że rozwój ten może być istotnie hamowany u nowo narodzonych prosiąt i cieląt przez karmienie mlekiem obcogatunkowym lub mlekiem pozbawionym aktywnych peptydów np. preparatem mlekozastępczym.

Siara i mleko zawierają znaczne ilości bioaktywnych peptydów i białek, których układ endokryny przewodu pokarmowego noworodka jeszcze nie wytwarza lub wytwarza w niewystarczających ilościach. Ich obecność w przewodzie pokarmowym noworodka stymuluje jego rozwój. Substancje te są syntetyzowane w gruczole mlekowym lub ekstrahowane z krwi. Wszystkie biologicznie aktywne peptydy i część białek są wydzielane do siary i mleka w postaci biologicznie aktywnej. Należą do nich m.in. hormony, peptydy regulacyjne przewodu pokarmowego, czynniki wzrostowe, enzymy, immunoglobuliny czy glikoproteiny. Substancje te wykazują aktywność biologiczną podobną do wytwarzanych przez organizm noworodka. Pozostałą część pokarmu matczynego stanowią białka nieaktywne, np. kazeina, laktoferyna, laktoalbuminy, będące z kolei źródłem bioaktywnych peptydów powstałych w świetle przewodu pokarmowego w wyniku hydrolizy tych białek. Stężenie biologicznie aktywnych peptydów mleka jest zazwyczaj dużo wyższe niż ich zawartość w osoczu matki i tkankach noworodka. Ponadto, ich ilość zmienia się w czasie laktacji i jest specyficzna gatunkowo.

Lista poznanych biologicznie aktywnych peptydów siary i mleka oraz ich właściwości biologicznych się powiększa. Mimo to, w dalszym ciągu jest wiele kontrowersji na temat możliwości „penetracji” przez biologicznie aktywne peptydy tkanek jelita, a także ich przechodzenia ze światła jelita do krwi obwodowej. Mimo dyskusowanego mechanizmu działania BAP siary i mleka, substancje te są bardzo ważne dla prawidłowego rozwoju organizmu w ciągu pierwszych dni po urodzeniu i wpływają na rozwój przewodu pokarmowego, a także całego organizmu. Przypisuje im się również rolę we właściwym uruchamianiu oraz programowaniu systemu endo- i neuroendokrynnego nowo narodzonych ssaków.

Zarówno siara, jak i mleko są bardzo wrażliwe na działanie czynników fizykochemicznych, zwłaszcza na temperaturę. Ze względów epidemiologicznych mleko przechowywane w bankach mleka, a następnie podawane wcześniakom i noworodkom musi spełniać nie tylko standardy żywieniowe, ale także być pokarmem biologicznie bezpiecznym. Od dawna wiadomo, że każdy proces technologiczny obniża wartość odżywczą mleka, a dodatkowo powoduje wysoce istotne obniżenie stężenia w nim bioaktywnych peptydów. Zastosowana w badaniach własnych metoda ciśnieniowania mleka wydaje się doskonałą alternatywą dla dotychczasowych metod pasteryzacji mleka, czego dowodem są przedstawione przez Doktorantkę wyniki badań własnych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Olgi Barbarskiej pt. „Optymalizacja składu mleka kobiecego przeznaczonego dla noworodka przedwcześnie urodzonego” obejmuje przeprowadzone przez Autorkę badania mające na celu charakterystykę oraz optymalizację składu



jakościowego i ilościowego mleka kobiecego w bankach mleka, które jest jedynym naturalnym i pełnowartościowym pokarmem dla wcześniaka w sytuacji bezmleczności biologicznej matki.

Sam wybór bardzo istotnego i aktualnego tematu badań z punktu widzenia problemów neonatologii, jakim jest wcześniactwo oraz problemy związane z żywieniem wcześniaków należy ocenić bardzo wysoko, jako zasadny naukowo dający możliwość transferu wyników badań do praktyki klinicznej.

Rozprawa doktorska mgr Olgi Barbarskiej jest zbiorem czterech prac: jednej pogłądowej oraz 3 oryginalnych, przedstawiona do recenzji w postaci 100-stronicowej wersji drukowanej formatu A4 w sztywnej oprawie. Układ dysertacji jest prawidłowy i zawiera spis prac wchodzących w skład rozprawy, wykaz skrótów, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wprowadzenie oraz uzasadnienie podjętego tematu zawierające teoretyczne podstawy problemu, cel pracy, metodykę badań, syntetyczne omówienie wyników, wnioski, piśmiennictwo oraz załączniki (cztery artykuły wchodzące w skład rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów dotyczące procentowego udziału w tworzeniu publikacji).

Jednotematyczne opracowanie pod wspólnym tytułem składa się z czterech publikacji, których łączna liczba punktów MNiSW wynosi 31 a sumaryczny IF = 2,335. Wszystkie artykuły dotyczą zagadnień związanych ze składem mleka oraz jego wartością odżywczą i biologiczną. Spełnione zostały tym samym ustawowe wymogi co do spójności tematycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki oraz wszystkich współautorów, wskazujące na istotny wkład Pani Barbarskiej w opracowaniu koncepcji badań, udziału w części eksperymentalnej oraz opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych prac.

Wstęp oraz uzasadnienie podjętego tematu badań wprowadza czytelnika w tematykę ocenianej rozprawy. Doktorantka w sposób czytelny wykazała istotną rolę mleka i bioaktywnych peptydów w fizjologii przewodu pokarmowego oraz ogólnym rozwoju organizmu noworodka. Przedstawiono również problemy związane z przechowywaniem mleka kobiecego w bankach mleka, a także opisano szereg problemów żywieniowych i klinicznych oddziałów neonatologicznych.

Zaplanowane w pracy badania zostały zrealizowane prawidłowo. Wykonane analiza i badania według Recenzenta w pełni umożliwią zrealizowanie postawionych celów. Na podkreślenie zasługuje fakt wysokiego i nowoczesnego poziomu analitycznego wykonanych badań i oznaczeń.

Jako cel pracy Doktorantka postawiła sobie weryfikację oraz opracowanie metod optymalizacji składu mleka kobiecego przeznaczonego dla noworodków przedwcześnie urodzonych. Do osiągnięcia celu, Doktorantka przeprowadziła badania w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania:

1. Czy skład mleka kobiecego jest adekwatny do zapotrzebowania żywieniowego noworodków przedwcześnie urodzonych – pokarmu biologicznej matki oraz pokarmu przekazywanego przez dawczynię do banku mleka kobiecego?
2. Czy możliwe jest wdrożenie nowoczesnej strategii wzmacniania mleka kobiecego-wzmacniania celowanego na podstawie pomiarów wykonywanych analizatorem składu mleka kobiecego?
3. Czy i jakie czynniki wpływają na skład mleka z banku mleka kobiecego w świetle możliwości optymalizacji procedur banku mleka?
4. Czy metoda pasteryzacji-standardowa metoda pasteryzacji typu Holder vs. alternatywna metoda pasteryzacji przy użyciu wysokich ciśnień – wpływają na wybrane bioaktywne składniki mleka kobiecego?

Najważniejszą część rozprawy stanowią artykuły omawiające badane zagadnienia oraz przedstawiające wyniki badań własnych:

1. Barbarska O, Gacparska M, Skubiszewska A, Olędzka G. Nutrigenomika w zdrowym starzeniu się. Gerontologia Polska. 2018;26(3):214-219, punkty MNiSW: 9.



2. Wesolowska A, Barbarska O, Karzel K, Pawlus B, Słodkowska Z. Zastosowanie analizatora mleka kobiecego w ocenie wartości odżywczej pokarmu przeznaczonego dla noworodków urodzonych przedwcześnie. *Standardy Medyczne. PEDIATRIA*. 2018;15(6):82-8, unky MNiSW: 8.
3. Barbarska O, Zielińska M, Pawlus B, Wesolowska A. Characteristics of the regional human milk bank in Poland-donors, recipients and nutritional value of human milk. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2017;68(4):395-400, punkty MNiSW: 14.
4. Wesolowska A, Sinkiewicz-Darol E, Barbarska O, Strom K, Rutkowska M, Karzel K, Rosiak E, Olędzka G, Orczyk-Pawilowicz M, Rzoska S, Boroszevska-Kornacka MK. New achievements in high-pressure processing to preserve human milk bioactivity. *Frontiers in Pediatrics*. 2018;6:323, IF: 2,335.

W pierwszej pracy omówiono wpływ wybranych bioaktywnych peptydów na zdrowie człowieka. Poruszono w niej bardzo popularne ostatnio zagadnienia programowania żywieniowego oraz nutrigenomiki, które odgrywają coraz to większą rolę w przestrzeni naukowej, jak i praktyce klinicznej. Badania z zakresu nutrigenomiki popularyzują wiedzę na temat zindywidualizowanego żywienia człowieka już od urodzenia. Zgodnie z ostatnimi wynikami badań zrozumienie interakcji zachodzących między ludzkim genomem a składnikami diety umożliwia precyzyjne sterowanie funkcją genomu, a tym samym utrzymania optymalnego stanu zdrowia człowieka od chwili narodzin aż po okres starzenia. Jest to szczególnie istotne z punktu widzenia wcześniactwa, gdzie niezbędne jest wprowadzenie indywidualnej strategii żywienia, a tym samym poszukiwanie optymalnego pokarmu w bankach mleka kobiecego.

W drugiej pracy Doktorantka kontynuuje myśl celowego i indywidualnego żywienia wcześniaków i noworodków z wykorzystaniem pokarmu pochodzącego z banków mleka o określonej wartości odżywczej i biologicznej. W pracy tej szczegółowo omówiono procedury wykonywane w banku mleka. Wskazano na szczególną rolę pracowników BMK, od których zależy jakość przeprowadzanych analiz oraz wartość mleka. Wskazano, jak istotne jest próbkowanie pokarmu do analiz, na podstawie których układana jest indywidualna strategia wzmacniania celowego. W pracy tej opisano również metodę optymalizacji mleka biologicznej matki, jak i pokarmu z BMK z użyciem wzmacniaczy.

Wyniki pracy „Characteristics of the regional human milk bank in Poland-donors, recipients and nutritional value of human milk”, wskazały na silne zróżnicowanie zawartości składników odżywczych w mleku pochodzącym z BMK. Z danych zaprezentowanych w niniejszym opracowaniu jednoznacznie wynika, że ujednoczenie materiału biologicznego jest niezmiernie trudne a wręcz niemożliwe. W związku z powyższym niezbędna jest ścisła współpraca klinicystów z BMK w celu odpowiedniego doboru pokarmu do indywidualnych potrzeb wcześniaków i noworodków. W ocenie Recenzenta w pracy poruszono jeszcze jeden, bardzo ważny aspekt możliwości wykorzystania mleka kobiecego, a mianowicie dzielenie się nadwyżkami z innymi biorcami. W ostatnich latach coraz częściej propaguje się, idę podawania mleka jako „leku” w chorobach nowotworowych. Po raz kolejny wskazano również na fakt, że mleko z BMK ma zmieniony skład pod względem zawartości składników bioaktywnych, które ulegają całkowitemu lub częściowemu zniszczeniu pod wpływem obecnie stosowanej pasteryzacji typu Holder. W związku z tym zasadne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych metod/technik optymalizacji składu mleka przy zachowaniu jego aktywności i właściwości biologicznych.

W ocenie Recenzenta najcenniejszą osiągnięciem doktoratu jest praca czwarta, która porównuje wpływ metody HPP (high-pressure processing) oraz standardowej pasteryzacji typu Holder na stężenie wybranych bioaktywnych czynników mleka. Badane próby pasteryzowano tradycyjną metodą Holdera lub jednym z czterech wariantów procesu ciśnieniowania: 1) 600 MPa, 10 minut 2) 100 MPa, 10 minut, przerwa 10 minut, 600 MPa, 10 minut 3) 200 MPa, 10 minut, przerwa 10 minut, 400 MPa, 10 minut 4) 200 MPa, 10 minut, przerwa 10 minut, 600 MPa, 10 minut. W wyniku pasteryzacji metodą Holdera, stężenie wybranych czynników było istotnie niższe w porównaniu do mleka surowego, niepoddanego żadnym procesom. Natomiast wszystkie warianty HPP powodowały istotny wzrost stężenia leptyny, insuliny, HGF oraz laktoferyny w porównaniu do mleka pasteryzowanego metodą Holdera. Prezentowane wyniki badań jednoznacznie potwierdzają skuteczność metody HPP jako metody

utrwalania mleka, która pozwala na zachowanie jego najlepszych właściwości bioaktywnych. Jednocześnie Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników wytypowała optymalne warunki ciśnieniowania mleka wskazując na wariant numer 3: 200 MPa, 10 minut, przerwa 10 minut, 400 MPa; jako optymalny. Co najcenniejsze, praca jest również pierwszym badaniem wykazującym możliwość zastosowania HPP do zachowania w utrwalanym mleku, hormonów takich jak insulina, leptyna czy adiponektyna, ważnych dla regulacji metabolizmu oraz procesów rozwojowych organizmu wcześniaka i noworodka.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Olgi Barbarskiej uważam, że Autorka bardzo dobrze posługuje się nowoczesną metodyką badawczą, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy eksperymentatorskiej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Należy bezwzględnie podkreślić wysoką wartość przeprowadzonych badań. Co więcej, uzyskane wyniki pozwalają stawiać kolejne hipotezy i stanowić doskonały materiał do kolejnych badań.

Mając powyższe na uwadze, pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Barbarskiej pt. „Optymalizacja składu mleka kobiecego przeznaczonego dla noworodka przedwcześnie urodzonego” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauki o Zdrowiu, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Olgi Barbarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

