



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Klinika Neonatologii

Kierownik; prof. dr hab. med. Barbara Królak-Olejnik

Wasze pismo z dnia:	Wasz znak:	Nasz znak:	Data
		WL-30/ /23	Wrocław 29.05.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Agnieszki Chrustek,
pt.: „Analiza statusu antyoksydacyjnego i składu mleka kobiecego pozyskanego
od matek mieszkających na terenie województwa kujawsko-pomorskiego
w kontekście czynników matczynych”**

Karmienie piersią i mleko własnej matki stanowi złoty standard w żywieniu noworodków, niemowląt i małych dzieci. Zaleca się realizację opieki nad matką i noworodkiem wg programu o udowodnionej skuteczności, czyli „10 kroków do udanego karmienia piersią”, rekomendowanego przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) i Fundusz Narodów Zjednoczonych na Rzecz Dzieci (UNICEF). Mleko matki jest pokarmem pierwszego wyboru dla dzieci zdrowych i chorych, urodzonych o czasie i przed terminem. Zaleca się wyłącznie karmienie piersią do 6. miesiąca życia, natomiast dalsze karmienie piersią, po włączeniu odpowiednich pokarmów uzupełniających, do 2 lat lub dłużej według życzenia matki i dziecka. Mleko kobiece zawiera wyjątkową kompozycję składników w tym antymikrobiologiczne, przeciwzapalne, immunoregulujące, a także żywe komórki, uczestniczące w rozwoju układu immunologicznego dziecka. Badania i metaanalizy potwierdzają związek wyłącznego karmienia piersią przez 6 miesięcy z obniżeniem wskaźnika infekcji dolnych dróg oddechowych, ostrej biegunki, zapalenia uszu i otyłości. Dodatkowa żywność podawana wcześniej niż w 6 miesiącu nie przynosi korzyści dla dziecka karmionego piersią w zakresie wzrastania, rozwoju ani niedoboru żelaza, a może być związana ze zwiększonym ryzykiem nadwagi lub

otyłości, szczególnie jeżeli została włączona przed 4 miesiącem życia. Według The European Food Safety Authority Panel on Nutrition, Novel Foods, and Food Allergens większość niemowląt nie wymaga dodatkowej podaży produktów innych niż mleko z powodów żywieniowych aż do około 6 miesiąca życia. Skład mleka kobiecego dostosowuje się do wymagań karmionego dziecka, jest jednak różny w zależności od czynników okołoporodowych, matczyńskich - występowania chorób, przyjmowania leków, wieku, masy ciała, środowiskowych, a przede wszystkim od fazy laktacji i czasu karmienia. Wiele prac opublikowano w tym zakresie, ale temat nadal jest otwarty. Brakuje danych dotyczących dużych grup matek karmiących i składu ich mleka zależnego od pory karmienia, diety, zwłaszcza eliminacyjnej, schorzeń przewlekłych czy miejsca zamieszkania. Zatem temat poruszony przez doktorantkę jest szczególnie interesujący dotyczy bowiem analizy statusu antyoksydacyjnego i wybranych elementów składu mleka dojrzalego i mleka kobiet długokarmiących w zależności od różnych czynników matczyńskich.

Rozprawa doktorska ma układ typowy, na 239 stronach maszynopisu mgr Agnieszka Chrustek zawarła wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo i aneks z wykazem stosowanych skrótów, wykazem macierzy korelacji, spisem tabel i rycin, wzorem ankiety oraz zgód dla uczestniczek badania, a także zgody komisji bioetycznej. W sposób bardzo szczegółowy, przedstawiła najistotniejsze dane dotyczące karmienia piersią. Znaczenia tej formy żywienia zarówno dla dziecka jak również matki karmiącej. Fizjologia laktacji została nie tylko opisana, ale również zobrazowana graficznie. Wątpliwość budzi jedynie fakt skopiowania grafik 1, 2, 4, 5, 6 z zacytowanych pozycji piśmiennictwa, czy uzyskano zgody autorów lub/i wydawnictwa na publikację w pracy doktorskiej? Bardzo szczegółowo został opisany skład mleka kobiecego, z uwzględnieniem makroskładników, bioaktywnych czynników mleka, witamin i mikroelementów a także mikrobiomu. Uwzględniono także czynniki wpływające na zmienność składu mleka. Przedstawiono stosunkowo obszernie właściwości mleka wynikające z wielu przeprowadzonych badań, stanowiące o korzystnym wpływie karmienia naturalnego na zdrowie dziecka. Opisane zostały właściwości antyoksydacyjne mleka wraz ze zmiataczami wolnych rodników, w skład których wchodzi antyoksydanty drobno- i wielkocząsteczkowe, o których wiadomo, że wykazują znaczną zmienność zależną od czynników matczyńskich, środowiskowych, genetycznych.

Celem pracy była analiza składu oraz statusu antyoksydacyjnego mleka kobiet mieszkających w województwie kujawsko-pomorskim, po uwzględnieniu wybranych czynników matczynych. Wydzielono kilka celów szczegółowych dotyczących :analiz mleka

1. dojrzałego i kobiet długokarmiących
2. pochodzącego ze zbiórki dziennej i nocnej
3. kobiet weganek i pozostających na diecie nieeliminacyjnej
4. kobiet z niedoczynnością tarczycy i alergią
5. kobiet w zależności od miejsca zamieszkania na terenie województwa kujawsko-pomorskiego.

Badanie zostało zaakceptowane przez komisję bioetyczną przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy (nr: KB 437/2018 z dn. 23.05.2018, 18.12.2018 oraz 29.09.2020r.).

Materiał i zastosowane metody badań zostały szczegółowo opisane przez doktorantkę. Brakuje jednak danych dotyczących sposobu pozyskiwania mleka od kobiet karmiących. Zgoda Komisji Bioetycznej dotyczy zarówno matek, dawczyń mleka do Banku Mleka Kobiecego, jak również bezpośrednio do Katedry Patobiochemii i Immunochemii Klinicznej, zatem ile kobiet było dawczyniami? Jak pozyskiwano mleko kobiet weganek? Nie określono również czasu prowadzenia badania - pierwsza opinia Komisji Bioetycznej datowana jest na rok 2018, ostatnia przedłuża czas trwania badania do końca 2023r. Dane dotyczące kobiet karmiących pochodzą z ankiety, której wzór załączono do dysertacji. Czy ankietę poddano walidacji? W jaki sposób przekazywano ankiety i czy pozyskano wszystkie wydane ankiety i dane od wszystkich kobiet?

Z opisu materiału wynika, że włączono do badania 107 kobiet karmiących, które w bardzo pracochłonnej procedurze odciągały mleko trzy razy w ciągu dnia i jeden raz w nocy, przekazując do badania 30 ml mleka dziennego i 10 ml mleka nocnego. Wydzielono natomiast wiele grup, w tym matki w III fazie laktacji (60), długokarmiące (47), weganek (17), nie stosujące diet eliminacyjnych, zdrowe (27), a także leczone z powodu niedoczynności tarczycy (29) i alergii (27). Ze względu na miejsce zamieszkania wyodrębniono 2 grupy kobiet - mieszkające w centrum miasta (54) i na obrzeżach oraz na wsi (53). Doktorantka napisała, że do badania włączono 107 kobiet, czyli wśród tej grupy pacjentek wydzielono długokarmiące i karmiące w III fazie laktacji. Z tej grupy też wydzielono weganek, czy były one karmiące w III fazie, czy długokarmiącymi? Na jakiej podstawie rozpoznano schorzenia matek? Czy uzyskano

badania dodatkowe pozwalające na postawienie rozpoznania? Czy przyjmowały leki? Jakie? W jakiej dawce? W jakiej fazie laktacji były kobiety z rozpoznaniem niedoczynności tarczycy i alergii? Charakterystyka kobiet karmiących nie jest jednoznaczna. Mleko przekazywane było do laboratorium w ciągu 24 godzin, porcjowane i zamrażane początkowo w -20°C , a następnie -80°C . Następnie, to znaczy kiedy? Jak długo mleko było mrożone w -20°C ? Czy makroskładniki mleka były oznaczane przed zamrożeniem. Metody analityczne zostały opisane bardzo szczegółowo, mimo, że większość badań oparta była na komercyjnych testach. Makroskładniki mleka oznaczano przy pomocy analizatora MIRIS HMA, dla analizy stężenia hormonów i melatoniny, a także aktywności paraoksonazy 1, stosowano testy ELISA. Aktywność antyoksydacyjną mleka z zastosowaniem rodnika DPPH, zdolność do redukcji jonów Fe^{3+} oraz stężenie polifenoli oceniano za pomocą metod spektrofotometrycznych. Do oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej - TAS zastosowano komercyjny test immunoenzymatyczny. Natomiast dla oznaczenia stężenia żelaza, magnezu, fosforu oraz wapnia stosowano metody kolorymetryczne. Stężenie witamin D - $25(\text{OH})\text{D}_3$ i B6 oznaczano stosując komercyjne testy immunoenzymatyczne.

W stosunku do zaprezentowanych wyników dobrze dobrano metody statystyczne. Wykorzystano pakiet oprogramowania Statistica 13.1. Do oceny korelacji zastosowano test Spearmana, a siłę związku między parametrami interpretowano według J.Guilford'a. Korelacje przedstawiono za pomocą macierzy korelacji.

Charakterystykę badanej grupy warto umieścić w rozdziale Materiały i Metody - została umieszczona w wynikach. Średni wiek kobiet wynosił $29,23 \pm 4,29$ dla weganek do $30,74 \pm 2,68$ lat, dla grupy kontrolnej. Przedstawiono także wartość BMI od $21,30 \text{ kg/m}^2$ dla kobiet chorujących na niedoczynność tarczycy do $23,05 \text{ kg/m}^2$ dla grupy kontrolnej zdrowych matek karmiących oraz WRH (stosunek obwodu talii do obwodu bioder) od $0,78$ dla matek weganek i chorujących na niedoczynność tarczycy do $0,81$ dla grupy kontrolnej zdrowych kobiet karmiących, spożywających normalną dietę, nieeliminacyjną oraz mieszkających na obrzeżach miast i na wsi. Wszystkie kobiety urodziły w terminie średnio w 40. (zakres od 39 do 41) tygodniu ciąży. Brakuje danych dotyczących okresu laktacji w którym pozyskiwano mleko (tygodnie, miesiące). Kto dokonywał pomiarów BMI i obwodów talii i bioder, czy wykonywała te pomiary jedna osoba, kiedy? W dniu pozyskiwania mleka, czy po porodzie?

Olbryzmia ilość wykonanych analiz, wiele policzonych zależności, natomiast grupy pacjentek bardzo słabo scharakteryzowane i niejednoznaczne. Szkoda, że Doktorantka

nie skupiła się wyłącznie na aktywności antyoksydacyjnej mleka kobiecego w różnych grupach kobiet karmiących. Na wiele pytań nie znalazłam odpowiedzi w tak bardzo rozbudowanej dysertacji. Kto stanowił grupę kontrolną dla wszystkich wydzielonych i analizowanych grup? Mleko dojrzałe, to mleko pozyskane w okresie od 1 do 12 miesiąca laktacji. Czy w okresie 12 miesięcy nie wykazuje zmienności, nawet tylko w zakresie makroskładników? Czy mleko kobiet długokarmiących (powyżej 12 miesięcy do 3 lat) nie wykazuje zmienności zależnej od czasu i częstości karmień?

Zatem czy weganki były matkami karmiącymi w pierwszym roku, czy ponad 12 miesięcy po porodzie? Czy zdefiniowano weganizm i wegetarianizm, tak, że pytanie w ankiecie było zrozumiałe dla uczestniczących w badaniu matek? Czy pytanie dotyczyło schorzeń obecnych w czasie laktacji, czy schorzeń, z którymi borykała się matka w przeszłości? Kto i w jaki sposób weryfikował odpowiedzi udzielone na pytania zawarte w ankiecie? Łącznie oznaczono 15 różnych elementów zawartych w mleku, nie wliczając makroskładników. Wydzielono ponad 10 różnych grup, w tym grupy kontrolne. Szczególnie istotne dane dotyczyły mleka kobiet długokarmiących. Zawierało ono więcej tłuszczu i było bardziej kaloryczne, zarówno w ciągu dnia, jak i w nocy. Wykazano także więcej białka całkowitego i odżywczego w nocy, w porównaniu z mlekiem III fazy. Nie wykazano różnic w stężeniach hormonów, ani statusie antyoksydacyjnym. Grupy nie były liczne, ale warto wydzielić kobiety karmiące wyłącznie piersią i w ogóle karmiące do 12 miesiąca po porodzie, natomiast wśród długokarmiących - karmiące do 2 lat i dłużej niż 2 lata.

Mleko matek weganek charakteryzowało się wyższym stężeniem kortyzolu (o 61%) oraz niższym statusem antyoksydacyjnym w porównaniu z grupą kontrolną matek spożywających normalną dietę. Wykazano niższą o 32% całkowitą aktywność antyoksydacyjną (TAS), o 27% aktywność FRAP, o 29% stężenie PON1 i o 11% stężenie polifenoli. Odnotowano także niższe stężenie żelaza oraz witaminy B6. Czy oceniona dieta tych kobiet była zbilansowana, jakich ograniczeń dotyczyła, czy suplementowały witaminę B12 i żelazo?

W mleku kobiet chorujących na niedoczynność tarczycy wykazano wyższe stężenie białka całkowitego oraz odżywczego w porównaniu z mlekiem kobiet zdrowych. W mleku tych matek wykazano także niższą całkowitą aktywność antyoksydacyjną. Czy kobiety były pod kontrolą specjalisty, czy przyjmowały leki i jakie były stężenia hormonów tarczycy?

Mleko kobiet z rozpoznaną alergią zawiera wyższe stężenie tłuszczu, suchej masy oraz ma większą kaloryczność w porze nocnej. Większą kaloryczność

potwierdzono także w mleku dziennym w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych matek. Czy w trakcie badania kobiety miały objawy alergii, czy przyjmowały leki?

Nie stwierdzono wpływu miejsca zamieszkania na zmienność składu mleka ani statusu antyoksydacyjnego. Wykazano natomiast niższe o 32% stężenie kortyzolu i o 9% melatoniny w mleku nocnym kobiet mieszkających na obrzeżu miasta i na wsi w stosunku do kobiet mieszkających w centrum miasta.

W dyskusji Doktorantka szeroko omawia własne wyniki i porównuje z danymi z piśmiennictwa.

Na podstawie przeprowadzonych analiz przedstawiła kilka ciekawych wniosków.

1. Skład i status antyoksydacyjny mleka kobiecego zmienia się w zależności od fazy laktacji (mleko dojrzałe/mleko kobiet długokarmiących), pory dnia i nocy, diety, występowania chorób (niedoczynność tarczycy/alergia), miejsca zamieszkania oraz rodzaju porodu.

2. Status antyoksydacyjny mleka kobiet długokarmiących utrzymuje się na tym samym poziomie jak mleka dojrzałego, co sugeruje zapewnienie dobrej ochrony przeciw wolnym rodnikom

3. Mleko nocne zapewnia skuteczniejszą ochronę przeciw wolnym rodnikom w porównaniu z mlekiem dziennym.

4. Wyższe stężenie kortyzolu w mleku weganek może świadczyć o stresie pojawiającym się u kobiet karmiących, a także o zaburzeniach uwalniania glukozy, regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej i białkowej oraz osłabieniu ochrony przeciw wolnym rodnikom.

5. Zawartość witamin (B6) i mikroelementów (Fe) w mleku weganek potwierdza zmienność zależną od sposobu odżywiania. Leczona niedoczynność tarczycy nie wpływa na zmiany poziomu badanych hormonów w mleku kobiecym

6. Mieszkanie w centrum miasta może być bardziej stresujące, stąd wyższy poziom kortyzolu w pokarmie matek tam żyjących.

Przedstawione wnioski są zbyt odważne. Zwłaszcza wniosek 4. - na jakiej podstawie Doktorantka wnioskuje o zaburzeniach uwalniania glukozy, regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej i białkowej? Wyższe stężenie kortyzolu w mleku kobiecym może powinno być porównane ze stężeniem w surowicy krwi czy analizą czynników stresogennych. Czy zawsze wynika tylko z działania stresu? Wniosek 5 też jest zbyt jednoznaczny, należałoby napisać, że dieta eliminacyjna (wegańska) może doprowadzić do niedoboru witaminy B6 i żelaza w mleku, stąd konieczność suplementacji. Podobnie w sytuacji niedoczynności tarczycy (wniosek 6), brak danych

w dysertacji dotyczących przyjmowanych leków i poziomów hormonów tarczycy w surowicy, zatem skąd wiadomo, że niedoczynność jest leczona. Może należałoby napisać, że nie uzyskano zmian składu mleka u kobiet, które w badaniu ankietowym potwierdziły niedoczynność tarczycy.

Wniosek ostatni odwróciłabym pisząc, że kobiety zamieszkujące obrzeża miast i wsie wykazują niższy poziom stresu, warto byłoby umieścić tu dane dotyczące wykształcenia, zawodu, wykonywanej pracy i statusu socjoekonomicznego.

Wyjaśnienia wymaga liczba włączonych do badania kobiet. 107 stanowią kobiety, które dostarczyły mleko dojrzałe (60) oraz te które długo karmiły (47), zatem które z nich były wegankami (17) i stosującymi normalną dietę (27), które z nich chorowały na niedoczynność tarczycy (29) i alergię (27), które mieszkały w centrum miasta (54) i na obrzeżach oraz na wsi (53). Warto omówić grupy szczegółowo w trakcie publicznej obrony, ale również w przygotowaniu pracy do druku.

Warto również ujednoczyć określenia medyczne, które już zadomowiły się w polskiej nomenklaturze - mleko kobiece, nie mleko ludzkie, nie stosujemy też określenia pokarm matek, czy pokarm ludzki, raczej pokarm naturalny. Kilka zdań wymaga stylistycznego przeredagowania. Kilka literówek wymaga poprawienia str. 157 - metody spektrometryczne, powinno być spektrofotometryczne.

Warto piśmiennictwo uzupełnić o aktualne zalecenia AAP dotyczące karmienia piersią - Meek JY, Noble L; Section on Breastfeeding. Policy Statement: Breastfeeding and the Use of Human Milk. Pediatrics. 2022;150(1):e2022057988, a także zacytować jedną z pierwszych, o ile nie pierwszą polską publikację dotyczącą mleka kobiet długokarmiących - Czosnykowska-Łukacka M, Królak-Olejnik B, Orczyk-Pawitowicz M. Breast Milk Macronutrient Components in Prolonged Lactation. Nutrients. 2018;10(12):1893. doi: 10.3390/nu10121893.

Niektóre dane uzyskane po analizie statystycznej wymagają wyjaśnienia. Czy grupa kontrolna była wspólna dla grupy II, III i V. W jakim okresie laktacji (w którym miesiącu po porodzie) były weganki? 40 kobiet miało problemy z laktacją, 34 korzystało z poradni laktacyjnej, 30 otrzymało fachową poradę, a 37 miało problemy z gruczołem piersiowym. Wartości % nie odnoszą się do całej grupy włączonych do badania matek, zatem warto opisać formę porady, ilość porad i miejsce ich udzielania, podając rozpoznanie i zalecone postępowanie specjalisty w zakresie laktacji. Jak należy rozumieć problemy z gruczołem piersiowym? Określenie nie jest precyzyjne.

Uzyskane przez doktorantkę wyniki mają znaczenie nie tylko poznawcze, przede wszystkim praktyczne. Warto kontynuować badania w tym zakresie, zwłaszcza

poszerzając i wydzielając czyste grupy w podobnym okresie laktacji, zwłaszcza, że liczba analiz składników mleka i statusu antyoksydacyjnego jest bardzo duża, zatem warsztat badawczy jest olbrzymi, warto jednak podjąć współpracę z klinicystami w zakresie pozyskiwania i opracowania klinicznych danych matek karmiących.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Chrustek to wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe, aktualne tematycznie i dostarczające nowych dla wiedzy klinicznej danych, które uzasadniają konieczność kontynuacji badań w tym zakresie. Przeprowadzono bardzo ciekawe, a jednocześnie czasochłonne i wymagające olbrzymiego zaangażowania analizy mleka w różnych grupach matek karmiących.

Podsumowując stwierdzam, że drobne uwagi krytyczne nie mają wpływu na ocenę przedstawionej mi do recenzji pracy. Doktorantka w pełni odpowiedziała na zagadnienia postawione w celu pracy i wykazała się dużą wiedzą teoretyczną w temacie badania, a także umiejętnością prowadzenia i realizacji pracy naukowej.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Chrustek, pt. „Analiza statusu antyoksydacyjnego i składu mleka kobiecego pozyskanego od matek mieszkających na terenie województwa kujawsko-pomorskiego w kontekście czynników matczynych”, odpowiada merytorycznym i formalnym wymogom stawianym na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu oraz spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz.1688).

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Chrustek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK KLINIKI NEONATOLOGII
Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego
im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu

prof. dr hab. med. Barbara Królak-Olejnik

Prof. dr hab.n.med. Barbara Królak-Olejnik
Kierownik Katedry i Kliniki Neonatologii
UM we Wrocławiu