

Recenzja pracy na stopień doktora nauk o zdrowiu mgr Katarzyny Chojnackiej zatytułowanej:

„Stężenie histaminy w wybranych jogurtach probiotycznych”

Ostatnie lata przynoszą ogromny i dynamiczny postęp w badaniach i zrozumieniu zależności pomiędzy mikrobiotą jelitową a szeroko rozumianym dobrostanem i zdrowiem gospodarza. Jelito oraz mózg komunikują się ze sobą poprzez oś mózgowo-jelitową, czyli zespół neuronów łączących centralny układ nerwowy z przewodem pokarmowym i obecnym tam ekosystemem czyli zespołem mikroorganizmów jelitowych. Komunikacja ta ma charakter dwukierunkowy, angażując czynniki neuronalne, endokrynne oraz immunologiczne. Mikrobiota jelitowa wydzielając szereg substancji neuroaktywnych oraz immunokompetentnych wpływa na funkcje centralnego układu nerwowego, a bodźce działające na korę i struktury mózgowia mają wpływ na skład ilościowy i różnorodność mikrobioty. W świetle najnowszych badań te skomplikowane interakcje mają wielkie znaczenie w procesach odpowiedzi i tolerancji immunologicznej i patogenezie wielu chorób. Coraz większą rolę w modulacji mikrobioty i utrzymaniu eubiozy przypisuje się między innymi probiotykom. Zawsze należy pamiętać, że ich dobroczynne właściwości są ściśle szczepozależne i możliwości ich zastosowania w praktyce winny być potwierdzone badaniami klinicznymi. Prócz preparatów probiotycznych dostępnych na rynku farmaceutycznym w szerokim użyciu pozostają probiotyczne jogurty.

Jogurty probiotyczne zaliczane są do żywności funkcjonalnej, czyli wykazującej więcej korzystnej dla organizmu aktywności niż efekt odżywczy. Zawierają bakterie probiotyczne w tym bakterie fermentacji mlekowej zdolne w tym korzystnym środowisku (z zawartością białka, enzymów, kofaktorów, wody i chlorku sodu) do produkcji amin biogennych, a wśród nich – histaminy obdarzonej dużą aktywnością biologiczną, a gdy zostaje uwolniona lub dostarczona w nadmiarze – działaniem toksycznym i niebezpiecznym.

Temat dysertacji doktorskiej Pani mgr. Katarzyny Chojnackiej w erze rozwijającej się probiotykoterapii dotyczy więc aktualnego i ważnego problemu.

Mając na uwadze, że bakterie probiotyczne wykazują zdolność dekarboksylacji L-histydyny, a powstająca histamina jako związek o bardzo istotnej aktywności biologicznej może po spożyciu wykazywać potencjalne działanie toksyczne, Autorka ocenianej pracy na stopień doktora nauk o zdrowiu wybrała temat słuszny i postawiła sobie za cel :

- Ocenę wpływu czasu przechowywania wybranych jogurtów probiotycznych na stężenie występującej w nich histaminy
- Zbadanie zdolności do wytwarzania histaminy przez bakterie probiotyczne występujące w jogurtach w zależności od czasu ich przechowywania
- Wykazanie zależności pomiędzy ilością bakterii probiotycznych a stężeniem histaminy w jogurtach.

Realizując wyznaczone cele Autorka wykazała głębokie zainteresowanie poszukiwaniami naukowymi i umiejętność stworzenia warsztatu pracy badawczej oraz zaprezentowała rozległą wiedzę teoretyczną.

Przedstawiona mi do oceny praca o układzie typowym dla tego rodzaju opracowań jest przejrzysta, rzeczowa i zwarta : liczy 70 stron wydruku komputerowego, zawiera 1 tabelę i 17 rycin. Obejmuje zgodnie z zasadami wstęp, założenia i cele pracy, opisuje materiał i metody zastosowane w badaniach, ich wyniki poddane opracowaniu statystycznemu, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury bogaty i aktualny, obejmujący 149 pozycji , które w całości są poprawnie cytowane w tekście. Uzupełnienie stanowią: wykaz używanych w pracy skrótów i spis tabel i rycin.

Praca napisana została z dużą starannością, stanowi interesujące opracowanie kwestii o implikacjach praktycznych w klinice i życiu codziennym.

We wstępie przedstawione zostały bardzo ciekawe informacje z historii powstawania produktów probiotycznych, definicja i szeroki opis właściwości pro-, prebiotyków i synbiotyków, schemat badań probiotyków wg zaleceń FAO/WHO, bogata charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych ze szczególnym uwzględnieniem jogurtów probiotycznych – powstałaby z tego ciekawa monografia. Ciąg dalszy poświęcony jest ogólnej charakterystyce amin biogennych i szczegółowej roli histaminy i jej receptorów w organizmie człowieka.

Założenia i cele pracy już przedstawiono, lecz podkreślić należy raz jeszcze, że poszukiwanie odpowiedzi na zadane pytania posiada istotne implikacje praktyczne.

W dalszej części pracy Autorka przedstawia protokół badań i opisuje ich metodykę. Protokół badań obejmował takie oto kolejne etapy: **oznaczanie stężenia histaminy** w wybranych jogurtach probiotycznych (pięć komercyjnie dostępnych jogurtów probiotycznych bez dodatku owoców ani ich przetworów, $n=6$ dla każdego oznaczenia) na początku i na końcu okresu ich przydatności do spożycia, **przeprowadzenie badań optymalizacyjnych** dla wybranego jogurtu (ustalenie objętości podłoża MRS Broth oraz ilości dodanej L-histydyny jako substratu do produkcji histaminy dla hodowli bakterii probiotycznych), **oznaczanie stężeń histaminy w podłożach po hodowli bakterii** zawartych w wybranych jogurtach probiotycznych z dodatkiem i bez dodatku L-histydyny, **określenie liczby bakterii kwasu mlekowego rodzaju *Lactobacillus*** na podłożu MRS Agar w tych jogurtach **na początku i na końcu okresu przydatności do spożycia** oraz **pomiar wartości pH** badanych jogurtów **na początku i końcu okresu przydatności do spożycia**.

Autorka bardzo szczegółowo opisuje metodykę przeprowadzonych badań. Stężenia histaminy w badanych jogurtach probiotycznych i w jogurtach po hodowli na podłożu MRS Broth oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA, posiewy bakterii z jogurtów na podłożu MRS Agar dla oceny ilościowej wykonywano tradycyjną metodą płytkową a liczbę bakterii zliczano przy pomocy automatycznego licznika kolonii bakterii aCOLyte 3. Należy zdawać sobie sprawę, że Autorce zabrakło możliwości identyfikacji gatunkowej badanych bakterii występujących w badanych jogurtach, co sama uwzględniła w dyskusji. Pomiaru wartości pH dokonano pH-metrem stacjonarnym firmy ELMETRON z czujnikiem temperatury model CP-411.

Uzyskane wyniki poddano adekwatnej analizie statystycznej, dla oceny istotności przyjmując kryterium $p < 0,05$.

Wyniki badań przedstawione zostały w postaci rycin oraz wnikliwie omówione. Cenne z punktu widzenia praktyki klinicznej (i zalecanego postępowania dietetycznego w życiu codziennym) jest potwierdzenie obecności histaminy w probiotycznych badanych jogurtach oraz stwierdzenie, że jej stężenie znamienne statystycznie wzrasta wraz z upływem czasu przechowywania (nawet w prawidłowych warunkach). Stężenia histaminy oznaczanej w podłożach MRS Broth bez dodatku L-histydyny po hodowli bakterii pochodzących z badanych jogurtów na końcu okresu przydatności do spożycia było we wszystkich przypadkach znamienne wyższe niż na początku. Po hodowli z dodatkiem L-histydyny (w porównaniu z podłożem bez jej dodatku) stwierdzono znacząco wyższe stężenia histaminy we wszystkich analizowanych grupach, z zachowaniem tej samej prawidłowości:

znamiennie wyższej zawartości tej aminy w końcowym okresie przydatności do spożycia niż na jej początku.

W oparciu o badania na podłożach MRS Agar we wszystkich jogurtach wykryto obecność żywych bakterii *Lactobacillus*, lecz w czterech z pięciu badanych jogurtów ich liczba nie uległa zmianie wraz z czasem przechowywania. Wynika z tego, iż w końcowym okresie przydatności do spożycia wzrasta zdolność bakterii probiotycznych do wytwarzania histaminy. Jedynie w przypadku jednego jogurtu : Auchan L. casei natural, bakterie *Lactobacillus* były znamiennie bardziej liczne na koniec okresu przydatności do spożycia.

W tym miejscu chciałabym skierować do Doktorantki pytanie: Jak należy tłumaczyć to zjawisko? oraz czy konsekwencje zmiany liczby drobnoustrojów probiotycznych pod koniec okresu przydatności do użycia preparatu probiotycznego w porównaniu z jogurtem probiotycznym mają to samo znaczenie kliniczne?

Nie stwierdzono w badaniach ani zmian pH badanych jogurtów wraz z upływem czasu przydatności do spożycia, ani wpływu pH na stężenie zawartej w jogurtach histaminy czy na liczbę bakterii *Lactobacillus*. Jeszcze jedno pytanie które chcę postawić Doktorantce to prośba o wyjaśnienie wpływu pH środowiska na wytwarzanie histaminy?

Rzeczowa i kreatywna oraz wszechstronna dyskusja szeroko omawia uzyskane wyniki w zestawieniu z rezultatami innych badaczy zaangażowanych w tę problematykę oraz bogata jest w przemyślenia o znaczeniu klinicznym i praktycznym. Autorka daje w niej również wyraz swej świadomości na temat ograniczeń pracy, czyli braku możliwości identyfikacji gatunkowej badanych w jogurtach bakterii oraz istnienia możliwości wpływu innych czynników na zawartość w nich histaminy – jak aktywność enzymów uczestniczących w katabolizmie tej aminy (DAO).

Z rezultatów przeprowadzonego badania Autorka wyciągnęła słuszne wnioski przydatne w podejmowaniu działań dla opracowania przyszłych strategii postępowania dietetycznego u osób zdrowych jak i pacjentów ze schorzeniami, dla których istnieją bardziej groźne konsekwencje w wyniku zwiększonej podaży egzogennej histaminy.

PODSUMOWANIE

Całość dokonania oceniam bardzo pozytywnie. Przedstawiona mi do recenzji ciekawa i rzetelnie opracowana dysertacja Pani mgr Katarzyny Chojnowskiej spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 poz. 1789) . Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Zdrowia

Publicznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego zakończonych nadaniem stopnia doktora nauk o zdrowiu .

Barbara Skrzydło-Radomska

