

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk o zdrowiu  
mgr Katarzyny Chojnackiej  
nt

## STĘŻENIE HISTAMINY W WYBRANYCH JOGURTACH PROBIOTYCZNYCH

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Wydziału Nauk Medycznych w Zabrze  
pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Jerzego Jochema

W październiku 2007r. Amerykańskie Narodowe Instytuty Zdrowia zainicjowały Human Microbiome Project mający na celu poznanie genomów mikroorganizmów jako składników genomu człowieka, kształtujących jego metabolizm, wpływających na procesy fizjologiczne i patofizjologiczne. W badaniach nad mikrobiomem człowieka analizie poddano zwłaszcza mikroorganizmy występujące w jelitach. Szacuje się, że w jelitach występuje ponad tysiąc gatunków, zawierających ok 7 milionów genów, co oznacza, że na 1 ludzki gen przypada 360 bakteryjnych. Jelito zasiedlają bakterie komensalne, występujące tam normalnie, ale też i te, dostarczane wraz z pożywieniem. Mikroorganizmy jelitowe wpływają na równowagę energetyczną i biorą udział w trawieniu i metabolizmie licznych związków chemicznych, których organizm ludzki sam nie jest w stanie przekształcić, takich jak, np: błonnik, celuloza, pektyny, ligniny i in., a powstałe z nich cukry proste, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, octan, propionian, maślan, etc., człowiek, jako gospodarz, może wykorzystać dla dobrostanu jelit, ale też i całego organizmu.

Gdy w składzie mikrobiomu dochodzi do dysbiozy rozwijają się nie tylko przewlekłe schorzenia przewodu pokarmowego, także i ogólne (nowotwory, cukrzyca, otyłość). Wśród dostępnych terapii mających na celu przywrócenie właściwej mikrobioty jelitowej w przypadkach najcięższych stosuje się przeniesienie kału zdrowego dawcy, w innych, antybiotyki, probiotyki czy prebiotyki.

Nie jest truizmem stwierdzenie, że zamiast leczyć chorobę lepiej jej zapobiegać. Profilaktyka wnosi, na podstawie wiekowych już doświadczeń korzystnego efektu kwaśnych produktów mlecznych w leczeniu różnych chorób, zastosowanie pre- i probiotyków. Z drugiej strony, szereg autorów podnosi z kolei kwestie nietolerancji histaminy produkowanej przez bakterie z gr. *Lactobacillus* w tych środkach spożywczych, których technologia włączała fermentację mlekową.

Praca mgr Katarzyny Chojnackiej rozstrzyga, moim zdaniem, dylemat: „brać czy nie brać” czyli „włączać, czy nie włączać” probiotyków do swojej diety

Celem pracy Doktorantki było zbadanie zawartości histaminy i zdolności jej syntetyzowania przez występujące w jogurtach bakterie probiotyczne, a także określenie zależności między stężeniem histaminy a liczbą bakterii, pH jogurtu oraz czasem przechowywania jogurtu.

W badaniach użyto dostępne na rynku jogurty probiotyczne bez dodatków: Kaufland Pro Drink, Aldi BiActiv Milsa, Lidl Milbona, Actimel Danone, Auchan L. casei natural. Stężenia histaminy oznaczano metodą ELISA, przy wykorzystaniu zestawów firmy Beckman Coulter (nr IM 2562) i dokonując pomiarów przy użyciu spektrofotometru mikroplótkowego Eon™ firmy BioTek.

Bakterie zawarte w jogurtach posiewano na podłoże agarowe wg De Man, Rogosa i Sharpe (agar MRS), selektywne medium hodowlane, faworyzujące wzrost Lactobacilli. Badano liczbę bakterii probiotycznych na początku i końcu okresu przydatności jogurtów do spożycia oraz pH jogurtu.

Właściwe badania zostały poprzedzone badaniami wstępnymi, w których określono optymalne stężenia L-histydyny, prekursora histaminy dla ocenianych enzymów bakteryjnych.

Praca doktorska została starannie przygotowana i napisana jest bardzo ładnym językiem. Liczy 70 stron, w tym: Wstęp – 21 stron; Założenia i cele pracy - 2 strony, Materiały i metody 8 stron; Wyniki badań, które zostały przedstawione graficznie na 12 rycinach i omówione w towarzyszącym tekście, zajmują 10 stron; dalej jest Dyskusja – 9 stron; Wnioski, 1 strona; Streszczenie w j. polskim 1 strona; streszczenie w j. angielskim 1 strona; Piśmiennictwo 11 stron. Wstęp poprzedzają: Spis treści (2 str), Wykaz skrótów (1 str) oraz Wykaz Tabel i rycin (2 str).

W pracy zacytowano 149 pozycji piśmiennictwa. W przeważającej większości, bo aż 82 % to publikacje, które ukazały się po roku 2000. Wskazuje to na aktualność zagadnień stanowiących przedmiot badań podjętych w niniejszej rozprawie, i żywe nimi zainteresowanie.

Autorka zawarła we wstępie niezbędne informacje wprowadzające problem i jego bohaterów. Kolejne podrozdziały przybliżają mleczne napoje fermentowane, szczegółowo omawiają charakterystykę jogurtów probiotycznych, histaminę, jej metabolizm, funkcje i pośredniczące receptory, działanie toksyczne, zawartość w środkach spożywczych. Na str 27, 2gi akapit, wdarła się nieścisłość;

cytuję „równoczesna obecność putrescyny i kadaweryny, które są inhibitorami DAO i metylotransferazy histydynowej, powoduje 4-krotny wzrost toksyczności histaminy [87]” i prostuję: putrescyna i kadaweryna są diaminami i jako takie są substratami oksydazy diaminowej. Mogą co najwyżej kompetycyjnie hamować rozkład histaminy na ścieżce oksydacyjnej dezaminacji katalizowanej przez oksydazę diaminową, DAO, natomiast samego enzymu nie hamują.

Uzyskane przez mgr Chojnacką wyniki pokazują bez cienia wątpliwości, że jogurty probiotyczne nie spowodują „zatrucia histaminowego” za to dostarczą cennych żywych mikroorganizmów.

Oznaczone stężenia histaminy na początku i na końcu przydatności do spożycia jogurtów probiotycznych, pochodzących od pięciu różnych producentów, nie przekroczyły 1,2 mikrograma/ml, co oznacza, że nawet jeśli konsument spożyje 1 litr jogurtu probiotycznego to przyjęta dawka histaminy - 1,2 mg, będzie wielokrotnie niższa niż dopuszczalna w Europie czy w USA, odpowiednio, 200-400 mg/kg, czy 500 mg/kg.

Bakterie probiotyczne hodowane 72 h w warunkach optymalnych (37 st C) na podłożu MS Broth na początku i końcu okresu przydatności jogurtu, z czasem przechowywania zwiększyły produkcję histaminy maksymalnie o 30%, tj. do w/w 1.2 mikrograma/ml. Ten nieduży wzrost wynikał z ograniczonych zasobów białka mleka w jogurtach i nie był w żadnym wypadku uwarunkowany kiepską żywotnością mikroorganizmów; dodatek L-histydyny do podłoża (4g/l) spowodował ok. 10 krotny wzrost wytwarzanej histaminy (ok. 13mikrograma/ml tj. 13 mg/l).

Na podstawie rezultatów swoich badań Doktorantka stwierdziła, że wszystkie jogurty zawierały bakterie probiotyczne w liczbie co najmniej  $10^6$  bakterii/ml. Wraz z czasem przechowywania jogurtu zawartość histaminy wzrastała, przy czym ani liczba bakterii ani pH jogurtu nie miały na to wpływu. Podobnie, pH nie wpływało na liczbę bakterii.

Wnioski, które sformułowała mgr K. Chojnacka są prawidłowe.

Pragnę podkreślić, że wyniki zostały w obszernej dyskusji bardzo wielostronnie i rzeczowo przedyskutowane i odniesione do prac, jakie ukazały się w tym zakresie.

Dzisiaj stosowane metody oznaczania histaminy są dużo bardziej selektywne i bardziej czułe niż kiedyś. Niska zawartość histaminy w jogurtach probiotycznych

wskazuje, że nie taki diabeł straszny, jak go malują producenci preparatu DAOsin, pragnący sprzedać swój produkt jak największej liczbie osób. Koszt 1 kapsułki zawierającej oksydazę diaminową, rozkładającą histaminę, to 3-5 zł.

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgr Katarzyny Chojnackiej spełnia warunki określone w art.13 ust 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz 1789)

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie mgr Chojnackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Łódź, 13.05.2020