



UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁODZI

UNIwersytet Medyczny w Łodzi
KATEDRA GENETYKI KLINICZNEJ
I LABORATORYJNEJ
ZAKŁAD GENETYKI KLINICZNEJ
92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel./fax 42 272 57 67

Uniwersytet Medyczny
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakład Genetyki Klinicznej
Medycznej w Łodzi

dr hab. med. prof. nadzw. Maciej Borowiec
ul. Pomorska 251, A1, 9p
92-213 Łódź
tel/fax: 042 272-57-67
e mail: maciej.borowiec@umed.lodz.pl

Łódź, 01.08.2017r.

Recenzja pracy doktorskiej

pt., „Ocena jakościowa i ilościowa grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych” wykonaną przez mgr Beatę Kowalewską na Wydziale Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Zoreny oraz promotora pomocniczego dr n. fiz. Piotra Wąż.

Cukrzyca typu 1 (T1DM) jest chorobą autoimmunizacyjną o wieloczynnikowej etiologii, której istotą jest brak lub znaczny niedobór insuliny, spowodowany zniszczeniem komórek β wysp trzustki. Jest to choroba heterogenna co do etiopatogenezy, przebiegu klinicznego i markerów biologicznych. Na obecne poglądy dotyczące mechanizmów prowadzących do rozwoju cukrzycy typu 1 ogromny wpływ miała teoria duńskiego naukowca Jorna Nerupa opublikowana w czasopiśmie *Lancet* z 1974 roku. Badacz sformułował hipotezę o kluczowej roli genów układu HLA (*human leukocyte antigens*) i czynników środowiskowych (wirusowych) w rozwoju reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciwko komórkom β wysp trzustkowych. Szereg badań epidemiologicznych wskazuje na sezonowość zachorowań na T1DM, co z kolei sugeruje udział w rozwoju cukrzycy czynników infekcyjnych. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie wpływem mikroflory jelitowej na stan równowagi człowieka. Coraz więcej dowodów wskazuje, że bakterie i wirusy jak też grzyby drożdżopodobne mogą być zaangażowane w patogenezę cukrzycy typu 1. W kontekście całego mikrobiomu jelit, grzyby drożdżopodobne są ogólnie uważane za składnik nieliczny, stanowią około 0,1% mikroorganizmów jelitowych. Jednak pomimo, iż drożdżaki stanowią niewielki procent mikrobioty jelit, zmiana w ich ilości wpływa na skład flory bakterii zaburzając równowagę flory jelitowej.

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka





Magister Beata Kowalewska w pracy doktorskiej przyjęła za główny cel ocenę jakościową i ilościową grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych. Doktorantka skupiła się głównie na charakterystyce szczepów grzybów z rodzaju *Candida* ich lekowrażliwości oraz analizie parametrów immunologicznych w tym interleukinie 12 (IL12) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) u dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją powstałą na podstawie czterech opublikowanych prac w tym trzech opublikowanych w czasopismach międzynarodowych z wysokim impact factor (IF) oraz jednej opublikowanej w recenzowanym polskim czasopiśmie z punktacją MNiSW. Doktorantka w trzech pracach oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej przejrzyście, niezwykle wyczerpująco i konsekwentnie przedstawiała problem mikrobiomu jelitowego oraz wybranych parametrów immunologicznych u dzieci i młodzieży chorujących na T1DM. Magister Beata Kowalewska w trzech publikacjach jest pierwszym a jednej drugim autorem.

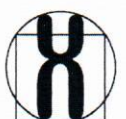
Łączna punktacja cyklu 4 publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi **MNiSW = 88 pkt., IF= 5.814.**

Kowalewska B, Kawko M, Zorena K, Myśliwiec M. Grzyby drożdżopodobne w układzie pokarmowym u dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2014;22(4):170-177, praca poglądowa. Punktacja MNiSW: 8 pkt.

Kowalewska B, Zorena K, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. Higher diversity in fungal species discriminates children with type 1 diabetes mellitus from healthy control. *Patient Prefer Adherence.* 2016. Apr 21;10:591-9. doi: 10.2147/PPA.S97852, praca oryginalna. Punktacja MNiSW: 30 pkt., IF=1.798

Kowalewska B, Zorena K, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. High interleukin-12 levels may prevent the increase the amount of fungi in the gastrointestinal tract during the first years of diabetes mellitus type 1. *Dis Markers.* 2016; 2016:4685976. S.1-10, doi: 10.1155/2016/4685976, praca oryginalna. Punktacja MNiSW: 25 pkt., IF=2.348

Zorena K, **Kowalewska B**, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. No influence of yeast-like fungi on lipid metabolism and vascular endothelial growth factor levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Ital. J. Pediatr.* 2016; vol. 42, art. ID 107, s. 1-7, praca oryginalna. Punktacja MNiSW: 25 pkt., IF=1.668



W przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej Doktorantka omówiła opublikowane w/w prace w formie wydruku będącego podstawą dysertacji liczącej 104 strony maszynopisu, 6 rycin, 5 tabel, 4 załączonych autorskich publikacji oraz 104 pozycji literaturowych w większości pochodzących z ostatnich lat. Tak przygotowana rozprawa doktorska w formie spójnego zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych jest zgodna z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym i nie budzi żadnych wątpliwości. Przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi oryginalnie przemyślany, wyjątkowo interesujący i świetnie zilustrowany wykład na temat mikroflory przewodu pokarmowego dzieci i młodzieży chorujących na T1DM.

Doktorantka w trzech pracach oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej przejrzyście, niezwykle wyczerpująco i konsekwentnie przedstawiała problem mikrobiomu jelitowego oraz wybranych parametrów immunologicznych u dzieci i młodzieży chorujących na T1DM. W pracy poglądowej wchodzącej w cykl prac stanowiącą podstawę dysertacji mgr Beata Kowalewska szczegółowo przedstawiła charakterystykę mikroflory przewodu pokarmowego z naciskiem na grzyby z rodzaju *Candida* i ich udział w zakażeniach przewodu pokarmowego u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka mikroflory przewodu pokarmowego jest bardzo aktualna, interesująca i nowatorska w świetle obecnych badań nad cukrzycą typu 1. Autorka dowiodła, że potrafi zastosować dostępne dane literaturowe, twórczo je opracowywać, systematyzować oraz trafnie wyciągać wnioski.

Przystępując do oceny merytorycznej badań przedstawionych w trzech oryginalnych publikacjach stanowiących oryginalne osiągnięcie Doktorantki stwierdzam, że przedstawione badania naukowe zostały zaplanowane wszechstronnie, oparte o nowoczesne, trudne techniki eksperymentalne, statystyczne wymagające znajomości tematu wykonywanych badań, które w pełni odpowiadają szczegółowym celom pracy.

Wyniki przedstawione w pierwszej oryginalnej pracy pt. „*Higher diversity in fungal species discriminates children with type 1 diabetes mellitus from healthy control*” mgr Beata Kowalewska przeprowadziła analizę ilościową oraz jakościową grzybów drożdżopodobnych w stolcu dzieci i młodzieży chorujących na T1DM oraz dobranej pod względem wieku i płci zdrowej grupie





kontrolnej. Ponadto Doktorantka wykonała ocenę lekowrażliwości izolowanych z kału grzybów *C. albicans* w odniesieniu do 6 leków przeciwgrzybiczych u dzieci i młodzieży chorujących na T1DM. Autorka przebadła 53 dzieci z T1DM oraz 30 zdrowych dzieci. Dojrzałość autorki zauważalna jest już na etapie doboru grupy badanej i jej charakterystyki klinicznej, biochemicznej oraz mikologicznej w pełni uzasadniając takie podejście. U dzieci i młodzieży chorujących na T1DM wykryto większe zróżnicowanie wyhodowanych gatunków grzybów drożdżopodobnych (T1DM – 47 szczepów w grupie kontrolnej – 21 szczepów). W obu grupach dominował gatunek *C. albicans* – T1DM 62%, kontrolna 85%. W kolejnym etapie badań Doktorantka przeprowadziła ocenę lekowrażliwości izolowanych grzybów *C. albicans* w odniesieniu do 6 leków przeciwgrzybiczych w tym 5fluorocytozynę, amfoterycynę, mikonazol, ketokonazol, itraconazol oraz flukonazol. W badanej grupie dzieci z T1DM w porównaniu do grupy kontrolnej wykryto większą ilość szczepów *C. albicans*, które wykazywały słabszą wrażliwość na badane leki przeciwgrzybiczne (72% u dzieci z T1DM a tylko 41% w grupie kontrolnej). Odwrotnie przedstawiała się aktywność enzymatyczna badanych szczepów *C. albicans* u pacjentów z T1DM. Doktorantka sugeruje, że w badaniach diagnostycznych należałoby rozważyć wykonywanie badań mikologicznych u dzieci z T1DM, w tym również badań ilościowych grzybów drożdżopodobnych w stolcu. W przypadku izolacji grzybów drożdżopodobnych konieczne jest określenie ich lekooporności ze względu na pojawianie się coraz większej ilości szczepów grzybów drożdżopodobnych opornych na stosowane leki przeciwgrzybiczne. Powyższe wyniki badań zostały w sposób wyczerpujący przedstawione i zilustrowane adekwatnymi rycinami i tabelami oraz poparte szeroką dyskusją międzynarodowym czasopiśmie [*Patient Preference and Adherence*, Kowalewska et al., 2016].

Celem drugiej pracy było zbadanie czy istnieje związek pomiędzy surowiczym poziomem interleukiny IL12 obecnością grzybów drożdżopodobnych u dzieci i młodzieży chorujących na T1DM oraz grupie kontrolnej. Problem powyższy jest niezwykle interesujący ze względu na unikalność modelu badawczego. Dotychczas rola IL12 w odporności na rozwój infekcji grzybiczych *C. albicans* została przedstawiona jedynie w eksperymentalnym mysim modelu. Natomiast nie znany jest status IL12 w kontekście infekcji grzybów drożdżopodobnych u pacjentów z T1DM. Kluczowym wynikiem otrzymanych badań przez Doktorantkę jest to, że u dzieci i młodzieży we

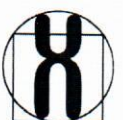




wczesnym etapie trwania cukrzycy typu 1 wykryto wysokie stężenie IL12 lecz niski odsetek kolonii grzybów drożdżopodobnych co może wskazywać, że nadprodukcja IL12 w pierwszych latach trwania cukrzycy warunkuje nie tylko utrzymanie stanu bez przewlekłych powikłań naczyniowych ale może chronić przed rozwojem nadmiernego rozplemu grzybów drożdżopodobnych zasiedlających przewód pokarmowy dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. To niezwykle interesujące zagadnienie dysertacji zostało szczegółowo przedstawione w oryginalnej publikacji "***High interleukin-12 levels may prevent the increase the amount of fungi in the gastrointestinal tract during the first years of diabetes mellitus type 1***", *Disease Markers*. 2016]. W opinii Doktorantki oraz współautorów niniejszej publikacji są to pierwsze na świecie dowody przemawiające za ochronną rolą IL12 przeciw infekcjom grzybów drożdżopodobnych przewodu pokarmowego dzieci i młodzieży z T1DM.

Ostatnim etapem powyższej dysertacji, niezbędnym co przeanalizowania złożoności problemu jest analiza wpływu grzybów drożdżopodobnych na profil lipidowy oraz stężenie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) u dzieci i młodzieży chorujących na T1DM. Jednym z ważniejszych celów terapeutycznych pacjentów cukrzycowych jest opóźnienie rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych w przebiegu cukrzycy. VEGF jest silnym czynnikiem mitotycznym i chemotaktycznym dla komórek śródbłonka, inicjującym powstanie odczynu zapalnego prowadzącego do zwiększenia przepuszczalności naczyń. Ze względu na brak jednoznacznych danych literaturowych na temat powikłań mikro- i/lub makro- naczyniowych u pacjentów z T1DM w kontekście profilu lipidowego vs. VEGF, autorka podjęła próbę analizy powyższych parametrów w badanych grupach. Uzyskane wyniki, porównania jak i przeprowadzone analizy statystyczne są szczegółowo omówione w oryginalnej publikacji „***No influence of yeast-like fungi on lipid metabolism and vascular endothelial growth factor levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus***”. *Ital. J. Pediatr.* 2016. Dyskusja w/w publikacji jest dojrzałą analizą parametrów biochemicznych, immunologicznych jak też patogennych w odniesieniu do grup wiekowych, czasu trwania choroby jak też stosowanych terapii u pacjentów z T1DM.

Na podstawie przeprowadzonych badań przedstawiono pięć precyzyjne i w pełni zasadnych wniosków. Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktorantkę celów



dysertacji. Ponadto, chciałbym podkreślić, że procedury metodyczne zastosowane w badaniach przez Doktorantkę charakteryzuje wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane narzędzia statystyczne wpisują się w trend światowych analiz statystycznych. Sposób omówienia wyników oraz przedstawienia ich w publikacjach jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań. Zawarte w powyższych artykułach dyskusje w sposób przejrzysty, ciekawy merytorycznie, transparentny i nie pozostawiający cienia wątpliwości na znajomości tematu prezentowanego przez Doktorantkę. Z dużą swobodą konfrontuje własne wyniki badań z wynikami badań renomowanych ośrodków na świecie.

Przedstawiona do oceny dysertacja została przygotowana poprawnie, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Drobne uwagi, jakie posiadam do przedstawionej pracy są natury edytorskiej. Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów stylistycznych czy natury językowej np. komórki \diamond kom. Kilka tych drobnych uchybień stylistycznych i tzw. literówek, które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia dla jakości i rangi rozprawy doktorskiej.

Niepodważalne znaczenie dla wartości pracy – którą pod względem merytorycznym oceniam bardzo wysoko, mogłaby być kontynuacją dalszych badań, na znacznie większym materiale z uwzględnieniem najnowszych technik identyfikacji mikrobiomu np. sekwencjonowanie najnowszej generacji NGS.

Jako Recenzent mam pytanie do Doktorantki czy identyfikacja mikrobiomu w niedalekiej przyszłości stanie się standardowym elementem diagnostyki..?! czy też celowanej terapii..?! a może prewencji..??! w grupie chorych na cukrzycę??

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiony mi do oceny cykl prac pt. **„Ocena jakościowa i ilościowa grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych”** mgr Beaty Kowalewskiej spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) dla rozprawy na stopień doktora.



Z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Beaty Kowalewskiej spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nową wiedzę na temat obecności grzybów drożdżopodobnych jako składników mikrobiomu jelitowego i ich zdolności modulacji procesów immunologicznych w przebiegu cukrzycy typu 1. Zwracam się zatem z wnioskiem do Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Beaty Kowalewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą Rektorską.

1-08-2012

Kierownik
Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi


dr hab. n. med. prof. nadzw. Maciej Borowiec

