



Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr biologii Beaty Kowalewskiej pt.:

Ocena jakościowa i ilościowa grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych

W ciągu ostatnich lat częstość występowania infekcji grzybiczych w populacji ludzkiej znacznie wzrosła. Najczęściej atakującym ludzki organizm gatunkiem grzyba jest *Candida albicans*. W dotychczasowych badaniach wykazano, że chorzy z cukrzycą typu 1 (T1DM) w dużym stopniu są narażeni na powikłania związane z rozwojem zakażeń grzybiczych. Wzrost grzybów obserwowany u chorych na cukrzycę może niekorzystnie wpływać na wyrównanie metaboliczne, prowadzić do zwiększenia zapotrzebowania na insulinę, jak też trudnej do wyleczenia objawowej grzybicy. Ryzyko rozwoju dolegliwości powiązanych z grzybicą będzie tym większe im więcej czynników ryzyka pojawi się u danej osoby i im bardziej patogenny będzie szczep wyizolowany od pacjentów z cukrzycą. Tematem wielu publikacji jest występowanie grzybów z rodzaju *Candida* w jamie ustnej u chorych na cukrzycę. Natomiast występowanie drożdżaków w układzie pokarmowym u dzieci z cukrzycą typu 1 jest zagadnieniem badanym w mniejszym stopniu a dotychczasowe, nieliczne wyniki badań są rozbieżne. W nurt badań nad występowaniem i znaczeniem infekcji grzybiczych w populacji dzieci chorych na cukrzycę typu 1 wpisuje się oceniana praca doktorska mgr biologii Beaty Kowalewskiej.

Przedstawione do oceny opracowanie jest realizacją przewodu doktorskiego tzw. nowym trybem i jest zbiorem opublikowanych prac Autorki wraz z ich omówieniem. W skład rozprawy wchodzi 4 prace: 1 pogładowa w języku polskim oraz 3 oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach zagranicznych. Łączna punktacja za cykl 4 publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi **88 pkt MNiSW, oraz 5,814 punktów Impact Factor**. Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech, a drugim w jednej pracy. Do wszystkich prac dołączono oświadczenia współautorów o udziale w tworzeniu manuskryptów oraz zgody na ich przedłożenie jako część rozprawy doktorskiej mgr Beaty Kowalewskiej.

Dziekanat Wydziału Nauk o Zdrowiu

Wpł. dnia..... 18 SIE. 2017

Nr-DNZ/..... 305/2017

Praca doktorska mgr Beaty Kowalewskiej liczy w sumie 102 strony (w tym 54 strony omówienie opublikowanych badań z piśmiennictwem). Omówienie rozpoczyna się od spisu treści, następnie zawiera wykaz używanych skrótów, wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wstęp, precyzyjny opis badanych grup oraz metod, przeprowadzonych badań, wnioski, piśmiennictwo (104 pozycje, głównie anglojęzyczne, w tym wcześniejsze prace pochodzące z własnego ośrodka), streszczenie w języku polskim i angielskim oraz załączoną zgodę Komisji Bioetycznej. Następnie Autorka załączyła oryginały prac stanowiących cykl będący podstawą do ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych. Praca została przygotowana wzorowo od względem edytorskim. W opublikowanych pracach zastosowano nowoczesne, nie budzące żadnych zastrzeżeń metody badawcze oraz statystyczne, a prezentacja wyników odpowiada zastosowanym testom i rozkładowi badanych zmiennych.

Opracowanie rozpoczyna wstęp będący wprowadzeniem w podstawy wiedzy o cukrzycy, charakterystyki grzybów z rodzaju *Candida* występujących w układzie pokarmowym człowieka, oraz omawia dotychczasową skąpą wiedzę na temat grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym u dzieci chorujących na cukrzycę typu 1. (**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).

Badaniem objęto 53 dzieci i młodzieży (19 dziewcząt i 34 chłopców w wieku 10.9 +/- 3.9 lat) z cukrzycą typu 1 leczonych w Przychodni Diabetologii Dziecięcej Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku. Wszyscy pacjenci byli w trakcie intensywnego leczenia insuliną (0.89 ± 0.21 IU insuliny na dzień/kg masy ciała). Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych dzieci i młodzieży (16 dziewcząt oraz 14 chłopców, zakres wieku 10.3 +/- 4.9 lat).

Za cel cyklu swoich prac Autorka przyjęła ocenę jakościową i ilościową grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych. Cele szczegółowe prac zostały również jasno sformułowane.

W pracy oryginalnej numer jeden (**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) zespół, którego członkiem jest Doktorantka określał częstość występowania kolonii grzybów drożdżopodobnych w kale, ich ilość, zróżnicowanie gatunkowe,

wrażliwość na leki oraz aktywność enzymatyczną. Obecność grzybów drożdżopodobnych wykazano w próbkach kału od 75.4% pacjentów z T1DM oraz 70% z grupy kontrolnej. U dzieci i młodzieży chorujących na T1DM zaobserwowano większe zróżnicowanie wyhodowanych gatunków grzybów drożdżopodobnych. W dodatknych próbkach kału od dzieci z T1DM otrzymano łącznie 47 szczepów grzybów drożdżopodobnych które należały do 9 gatunków. W zdrowej grupie kontrolnej wykryto 21 szczepów grzybów drożdżopodobnych, które należały do 4 gatunków. W badanej grupie dzieci z T1DM w porównaniu do grupy kontrolnej zaobserwowano większą ilość szczepów *C. albicans*, które wykazywały słabszą wrażliwość na badane leki przeciwgrzybiczne (72% u dzieci z T1DM a tylko 41% w grupie kontrolnej) oraz okazały się mieć wyższą aktywność enzymatyczną. Cennym wnioskiem z tego etapu badań jest stwierdzenie, że większa ilość szczepów wyhodowana z kału pacjentów z cukrzycą typu 1, o zmniejszonej wrażliwości na leki, a wyższej aktywności enzymatycznej, może mieć istotne znaczenie w przypadku wystąpienia czynników ryzyka rozwoju grzybicy i wpływ na trudności w leczeniu.

U pacjentów z T1DM jednym z ważniejszych celów leczenia jest zapobieganie rozwojowi przewlekłych powikłań naczyniowych. Z chwilą rozpoznania T1DM istotne jest kontrolowanie stężenia HbA1c, parametrów gospodarki lipidowej, ciśnienia tętniczego i innych uznanych czynników ryzyka przewlekłych powikłań naczyniowych. W świetle współczesnych badań wiadomo, że utrzymująca się przewlekłe hiperglikemia jest głównym lecz nie jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za naczyniowe powikłania w przebiegu cukrzycy. VEGF jest silnym czynnikiem mitotycznym i chemotaktycznym dla komórek śródbłonna, co stymuluje tworzenie nowych naczyń. VEGF jest istotnym czynnikiem inicjującym powstanie odczynu zapalnego w chorobach przewlekłych. Dane literaturowe dotyczące wpływu gospodarki lipidowej w T1DM nie są jednomyślne. Ponadto wciąż nie do końca znana jest rola grzybów drożdżopodobnych w przebiegu cukrzycy. W pracy numer dwa (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) Doktorantka i współautorzy podjęli próbę wykazania związku pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF, profilem lipidowym a ilością grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym u dzieci i młodzieży z T1DM. W grupie dzieci i młodzieży z T1DM bez powikłań zarówno mikro- jak też makronaczyniowych nie wykazano związku pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF a gospodarką lipidową. Nie wykazano także wpływu ilości grzybów drożdżopodobnych na wybrane parametry lipidowe jak też na stężenie VEGF u pacjentów z T1DM.

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 dzieci i młodzieży z T1DM. W trzeciej pracy cyklu (**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**) kolejnym etapem badań Autorki była ocena poziomu IL12 w surowicy krwi w odniesieniu do obecności grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym oraz wyrównania metabolicznego jak też czasu trwania choroby u dzieci i młodzieży z T1DM. W badanej grupie pacjentów z T1DM wykryto wyższy aczkolwiek w granicach normy [wg kryteriów EORTC/IFI], poziom przeciwciał *C. albicans* IgG w surowicy w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Wzrost poziomu przeciwciał *C. albicans*, zwłaszcza w klasie IgM może świadczyć o rozwoju aktywnego zakażenia. W badanej grupie pacjentów z T1DM wykryto negatywny poziom przeciwciał *C. albicans* w klasie IgM w surowicy krwi, który świadczy o braku infekcji przewodu pokarmowego w czasie badania u dzieci i młodzieży z T1DM. Kluczowym wynikiem badań Doktorantki jest to, że u dzieci i młodzieży we wczesnym etapie trwania cukrzycy do 2 lat wykryto wysokie stężenie IL12 lecz niski odsetek kolonii grzybów drożdżopodobnych w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania choroby > 2 lat<5 lat jak też w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania cukrzycy powyżej 5 lat. W dalszym czasie trwania choroby u pacjentów z czasem trwania choroby > 2 lat<5 lat oraz u pacjentów > 5 lat trwania cukrzycy wykryto spadek stężenia IL12 i wzrost odsetka kolonii grzybów drożdżopodobnych izolowanych z kału dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. Nadprodukcja IL12 w czasie pierwszych lat trwania cukrzycy warunkuje nie tylko utrzymanie stanu bez powikłań naczyniowych, ale może chronić przed rozwojem nadmiernego rozplemu grzybów drożdżopodobnych zasiedlających przewód pokarmowy. W opinii Doktorantki są to pierwsze dowody przemawiające za ochronną rolą IL12 przeciw infekcjom grzybów drożdżopodobnych przewodu pokarmowego dzieci i młodzieży z T1DM.

Całość omówienia pracy kończy 5 prawidłowo sformułowanych wniosków ze wszystkich trzech prac oryginalnych:

1. Grzyby drożdżopodobne izolowane z kału dzieci z T1DM były bardziej zróżnicowane gatunkowo w porównaniu do grzybów drożdżopodobnych izolowanych z kału dzieci grupy kontrolnej.
2. U dzieci i młodzieży chorujących na T1DM wykryto więcej szczepów *C. albicans*, które wykazywały słabszą wrażliwość na badane leki oraz okazały się mieć wyższą aktywność enzymatyczną w porównaniu do szczepów *C. albicans* izolowanych z kału dzieci grupy kontrolnej.
3. U pacjentów z 5-letnim czasem trwania cukrzycy typu 1, wysokimi poziomami IL12 oraz dobrą kontrolą metaboliczną częstość występowania grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym utrzymuje się na fizjologicznym poziomie.

4. Nadprodukcja IL12 w czasie pierwszych lat 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.
5. Nie wykazano wpływu ilości grzybów drożdżopodobnych na badane parametry profilu lipidowego, parametry wyrównania metabolicznego jak też VEGF w grupie dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

Całość pracy przeczytałam z ogromnym zainteresowaniem, jej treść świadczy o dojrzałych umiejętnościach Doktorantki dotyczących planowania i realizacji zadań badawczych oraz wyciągania prawidłowych wniosków. Niewątpliwie stanowi oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego. Recenzent jest pod wielkim wrażeniem skrupulatności nie tylko w projektowaniu i realizacji zamierzonych celów badawczych Doktorantki, ale także w przedstawieniu przez Autorkę uzyskanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożony cykl prac (rozprawa doktorska) mgr biologii Beaty Kowalewskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz 595 z późn. zm). W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr biologii Beaty Kowalewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Uzasadnienie

- 1) Opublikowanie wyników badań w postaci czterech, wysoko punktowanych prac, w 3 doktorantka jest pierwszym autorem (MNIŚZW = 88 pkt, IF = 5,14)
- 2) Bardzo pracochłonne, skomplikowane i nowoczesne techniki badawcze/statystyczne użyte do realizacji ambitnych celów
- 3) Oryginalny pomysł i nowatorskie opracowanie całości rozprawy
- 4) Niezbędna w dzisiejszej pracy naukowej praca zespołowa i organizacyjna w ramach realizacji projektów badawczych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Prof. dr hab. n. med.
Barbara Głowińska-Olszewska
Specjalista chorób dzieci
DIABETOLOG

Prof. dr hab. Barbara Głowińska-Olszewska