UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

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

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

Łódź, 5.07.2021r.

Recenzja pracy doktorskiej

pt. **„Jakościowe i ilościowe parametry jelitowej flory bakteryjnej u chorych z mono- i wielogenowymi formami cukrzycy"** wykonaną przez lekarza medycyny Sandrę Mrozińskę na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagielońskiego, Colegium Medicum pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Tomasza Klupy.

Cukrzyca stanowi grupę chorób metabolicznych o różnej patogenezie i obrazie klinicznym, których wspólną cechą są podwyższone wartości glikemii we krwi. Wynikają one z upośledzonej sekrecji insuliny przez komórki beta trzustki i/lub z nieprawidłowego działania insuliny na komórki docelowe.

Obecna klasyfikacja cukrzycy wyróżnia cukrzycę typu 1 (ang. *type 1 diabetes mellitus*, T1DM), cukrzycę typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM), inne specyficzne typy cukrzycy, w tym genetyczne defekty czynności komórek beta trzustki i działania insuliny, oraz hiperglikemię rozpoznaną po raz pierwszy w ciąży.

Osoby chorujące na T1DM wymagają dożywotniego podawania insuliny. Podstawową formą leczenia jest intensywna insulinoterapia realizowana przy pomocy osobistej pompy insulinowej lub z zastosowaniem wielokrotnych doposiłkowych wstrzyknięć insuliny oraz jednego wstrzyknięcia insuliny bazalnej na dobę przy pomocy wstrzykiwaczy typu pen [1]. Leczenie T1DM wymaga interdyscyplinarnego podejścia. W leczeniu pacjentów z T1DM bardzo ważną rolę pełni edukacja, postępowanie dietetyczne oraz wsparcie psychologiczne.

T2DM stanowi 90-95% wszystkich form cukrzycy [2,9,10]. Charakteryzuje się względnym niedoborem insuliny, do którego dochodzi w wyniku postępującej utraty zdolności komórek beta trzustki do sekrecji insuliny oraz w wyniku obwodowej oporności tkanek na insulinę [1].

T2DM jest jednostką chorobową o złożonej etiologii [10]. W jej patogenezie podkreśla się współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych. Z uwagi na duży wpływ modyfikowalnych czynników ryzyka na rozwój T2DM, leczenie tej jednostki chorobowej ma charakter wielowymiarowy. W procesie terapeutycznym istotną rolę odgrywa modyfikacja stylu życia, w tym postępowanie dietetyczne oraz podejmowanie przez pacjentów różnych form aktywności fizycznej.

Monogenowe formy cukrzycy są uwarunkowane głównie przez czynniki genetyczne, dziedziczenie mutacji w większości przypadków determinuje rozwój choroby. Czynniki środowiskowe mają znaczenie drugorzędne, mogą wpływać na przykład na wiek diagnozy i do pewnego stopnia na przebieg choroby. Dotychczas opisano 14 genów, których mutacje są związane z występowaniem cukrzycy typu MODY. W leczeniu stosuje głównie pochodne sulfonylomocznika, a w przypadku braku możliwości uzyskania zadowalającego wyrównania metabolicznego na pochodnych sulfonylomocznika sięga się po insulinę.

Elementem który od lat wiązany jest z charakterem powyższych jednostek chorobowych, i ciężkością ich przebiegu i manifestacja objawów jak tez odpowiedzią na farmako terapeutyki jest flora bakteryjna jelita grubego – mikrobiota.

Mikrobiota jelitowa odgrywa ważną rolę w organizmie człowieka. Między innymi pełni funkcje syntetyczne, metaboliczne, troficzne i protekcyjne. Uczestniczy w produkcji witamin, hormonów i neurotransmiterów, uczestniczy w metabolizmie leków, ksenobiotyków, a także kwasów żółciowych oraz rozgałęzionych i aromatycznych aminokwasów. Dominujące typy bakterii przewodu pokarmowego człowieka to Bacteroidetes i Firmicutes oraz w mniejszym odsetku procentowym Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia oraz Fusobacteria.

Pojęcie mikrobiota jelita grubego oznacza zbiór mikroorganizmów, które je zasiedlają, a mikrobiomem nazywamy wszystkie mikroorganizmy wraz z ich genami, występujące w danym ekosystemie, na przykład w organizmie człowieka.

Doktoranta lek. med. Sandra Morozińska za główny cel pracy doktorskiej przyjęła ocenę jakościowa i ilościowa (procentowa) parametrów mikrobioty jelitowej u chorych z mono- i wielogenowymi formami cukrzycy. Na który składają się cztery cele szczegółowe, dokładnie omówione w powyższej dysertacji.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją powstała na podstawie trzech oryginalnych prac, opublikowanych przez autorkę. Które przejrzyście, niezwykle wyczerpująco i konsekwentnie

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mali: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka

przedstawiają problem zaangażowanie mikrobiomu jelitowego i interakcję z różnymi formami cukrzyc, skupiając się na ich patogenezie i możliwościach terapeutycznych.

Łączna punktacja cyklu 3 publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi **MNiSW = 65 pkt., IF= 6.869.**

1. *Qualitative parameters of the colonic flora in patients with HNF1A-MODY are different from those observed in type 2 diabetes mellitus.* **Mrozinska S**, Radkowski P, Gosiewski T, Szopa M, Bulanda M, Ludwig-Galezowska AH, Morawska I, Sroka-Oleksiak A, Matejko B, Kapusta P, Salamon D, Malecki MT, Wolkow P, Klupa T. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 3876764. doi:10.1155/2016/3876764. **(IF = 2,717, punkty MNiSW = 25)**

2. *The effect of linagliptin treatment on gut microbiota in patients with HNF1A-MODY or type 2 diabetes — a preliminary cohort study.* **Mrozinska S**, Gosiewski T, Sroka-Oleksiak A, Szopa M, Bulanda M, Malecki TM, Klupa T. *Clinical Diabetology* 2019; 8(6): 263-270. doi: 10.5603/DK.2019.0024. **(punkty MNiSW = 20)**

3. *The gut microbiota profile according to glycemic control in type 1 diabetes patients treated with personal insulin pumps.* **Mrozinska S**, Kapusta P, Gosiewski T, Sroka-Oleksiak A, Ludwig-Gałęzowska AH, Matejko B, Kiec-Wilk B, Bulanda M, Malecki MT, Wolkow P, Klupa T. *Microorganisms* 2021; 9(1): 155. doi: 10.3390/microorganisms9010155. **(IF = 4,152, punkty MNiSW = 20)**

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją liczącą 82 stron. Zawierającą 33 metodologii pracy doktorskiej, pełnego tekstu trzech publikacji stanowiących trzon dysertacji oraz oświadczenia współautorów powyższych. Dysertacja poparta jest 90 pozycjami literaturowymi w większości pochodzących z ostatniego okresu czasu, które posłużyły do przygotowania monograficznej części poglądowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka badań jest bardzo aktualna, ciekawa i nowatorska w świetle obecnych badań nad mikrobiotą w obszarze problematyki klinicznej.

Przygotowany przez lek. med. Sandre Morozińską przegląd piśmiennictwa zawierający własne publikacje, stanowi oryginalnie przemyślany, wyjątkowo interesujący i świetnie zilustrowany wykład na temat mikroflory zasiedlającej nasze organizmy, jego skomplikowania ale tez niezwykle dużej

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mali: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka

różnorodności. Skupiając swoja uwagę na powiązaniu powyższej z rozwojem i przebiegiem, a także zaangażowaniem z określoną formą cukrzycy.

Autorka poniekąd sugeruje, iż to typ cukrzycy do pewnego stopnia determinuje mikrobiotę jelita grubego. W takiej sytuacji struktura mikrobioty mogłaby posłużyć do różnicowania niektórych typów cukrzycy. Wykazanie różnic w składzie mikrobioty okrężnicy pomiędzy tymi grupami mogłoby oznaczać, że istnieje związek pomiędzy składem mikrobioty, jako środowiskowego czynnika ryzyka, a rozwojem i przebiegiem określonych form cukrzycy.

Doktorantka dowiodła, że potrafi wykorzystywać dostępne dane literaturowe, twórczo je opracowywać, systematyzować i komentować.

Pracę rozpoczyna część teoretyczna licząca 16 stron.. Osobne rozdziały części teoretycznej stanowią zamierzone przejście do obszernego omówienia etiopatogenezy opisywanych form cukrzyc, podłoża fizjologicznego i aktualnego podejścia terapeutycznego, czynników środowiskowych i genetycznych oraz charakterystykę mikroflory przewodu pokarmowego z naciskiem na interakcje powyższej i jej udział w etiopatogenezie ale tez potencjalnej aktywności terapeutycznej.

Część doświadczalna pracy obejmuje 3 strony. Poświęcona jest charakterystyce grup badanych, oraz procedurę preparatyki i analizy materiału genetycznego mikroflory. Identyfikacji na poziomie taksonomicznym profili bakteryjnych próbek typu, klasy, rzędu, rodziny, rodzaju oraz gatunku. Opisaniu procedur metodycznych zastosowanych w prezentowanych badaniach, przedstawieniu narzędzi statystycznych jakimi posłużyła się autorka w powyższej pracy.

Na przeprowadzenie badań ujętych w pracy doktorskiej uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET/272/B/2013 oraz KBET/256/B/2014). Wszyscy uczestnicy badań wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniu, zgodnie z Deklaracją Helsińską.

Przystępując do oceny merytorycznej tej części recenzowanej rozprawy, muszę podkreślić, że prezentowane w niej badania zostały zaplanowane bardzo wszechstronnie, z uwzględnieniem doświadczeń analizujących różne uwarunkowania poszczególnych zagadnień. Przedstawiony tok realizacji zadania oparto o nowoczesne, techniki eksperymentalne, wymagające szczegółowej i precyzyjnej preparatyki materiału i sumienności wykonywanych oznaczeń.

Część eksperymentalna podzielona jest na trzy podrozdziały w pełni odpowiadające szczegółowym celom pracy, a przedstawione dane eksperymentalne znajdują swój udział w trzech oryginalnych publikacjach autora.

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

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

W pierwszym etapie badań Pani lek. med. Sandra Morozińska skupiła się na porównaniu mikrobioty okrężnicy, ocenionej z pojedynczej próbki kału, pomiędzy pacjentami z T2DM oraz pacjentami z cukrzycą monogenową związaną z mutacją w genie *HNF1A*. Dojrzałość autora zauważalna jest już na etapie doboru grupy badanej i jej charakterystyki, tworząc pod grupy w pełni uzasadniając takie podejście. Doktorantka, wykazała różnice w mikrobiocie pomiędzy grupami na różnych poziomach taksonomicznych. W mikrobiocie pacjentów z cukrzycą monogenową *HNF1A* MODY w stosunku do mikrobioty osób z T2DM wykazano większy względny odsetek bakterii klasy Erysipelotrichi, rzędu Turicibacterales, Erysipelotrichales, rodziny Clostridiaceae, Turicibacteraceae, Erysipelotrichaceae, niesklasyfikowanego rodzaju należącego do rodziny Clostridiaceae i rodzaju *SMB53* (rodzina Clostridiaceae). Nie zaobserwowano różnic w bioróżnorodności alfa i beta między pacjentami badanych grup. Powyższe dane zostały w sposób wyczerpujący przedstawione i zilustrowane adekwatnymi rycinami i tabelami oraz poparte wyczerpującą dyskusja opublikowana w oryginalnym i wysoko impaktowanym artykule autorki.

W kolejnych podrozdziale doktorantka porównuje strukturę mikrobioty jelitowej pacjentów przed i po czterech tygodniach od optymalizacji leczenia cukrzycy w zależności od zastosowanego leczenia. Do pierwszej grupy zakwalifikowano 9 pacjentów, u których do dotychczasowego leczenia cukrzycy dołączono linagliptynę, do drugiej grupy 15 pacjentów, u których intensyfikacja leczenia uwzględniała pochodną sulfonylomocznika. W kohorcie pacjentów (n = 9), w której zastosowano inhibitor DPP-4 nie zaobserwowano zmian w liczebności bakterii na poziomach taksonomicznych typu, klasy, rzędu, rodziny, i rodzaju (ANCOM) po dołączeniu do dotychczasowego leczenia linagliptyny. Nie wykazano różnic w bioróżnorodności alfa i beta. W grupie pacjentów, u których zastosowano sulfonylomocznik (n = 15) celem osiągnięcia wyrównania metabolicznego nie zaobserwowano zmian na poziomach taksonomicznych od typu do rodzaju bakterii, również nie wykazano zmian bioróżnorodności alfa i beta. Jednakże, uzyskano dane od 21 pacjentów z systemów ciągłego monitorowania glikemii. W grupie linagliptyny, mediana glikemii po intensyfikacji leczenia była istotnie niższa od wartości wyjściowej. W grupie drugiej, stanowiącej pacjentów, u których dokonano próby optymalizacji wyrównania metabolicznego poprzez zastosowanie pochodnej sulfonylomocznika, również uzyskano istotne obniżenie wartości glikemii.

W trzeciej publikacji dokonano porównania mikrobioty u pacjentów z T1DM w zależności od wyrównania metabolicznego. Grupa pierwsza objęła 46 pacjentów z T1DM i poziomem HbA1c

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mali: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka

większym lub równym 53 mmol/mol (≥ 7%), drugą grupę stanowiły 43 osoby z T1DM i poziomem HbA1c poniżej 53 mmol/mol (< 7%). Wykazano wyższy wskaźnik bioróżnorodności alfa w postaci wskaźnika Shannonna (p=0,04), wskaźnika równomierności Pielou (p = 0,02) oraz wskaźnika różnorodności Simpson'a (p = 0,01) u pacjentów z poziomem HbA1c większym lub równym 53 mmol/mol (≥ 7%) w porównaniu z osobami z HbA1c poniżej 53 mmol/mol (< 7%). Nie wykazano różnic między powyższymi grupami w odniesieniu do różnorodności beta ocenionej jako wskaźnik Bray-Curtis`a (p = 0,18), indeks Jaccard`a (p = 0,26), nieważony wskaźnik UniFrac (p = 0,59) i ważony wskaźnik UniFrac (p = 0,33). Porównano mikrobiotę pacjentów HbA1c < 53 mmol/mol (< 7%) oraz pacjentów pacjentów z HbA1c ≥ 53 mmol/mol (≥ 7%) wykorzystując narzędzie LEfSe. Wykazano, że u osób z HbA1c < 53 mmol/mol (< 7%) dominowała rodzina bakterii Ruminococcaceae, zaś w grupie pacjentów z HbA1c ≥ 53 mmol/mol (≥ 7%) rodzina bakterii Streptococcaceae oraz 4 gatunki bakterii (*Ruminococcus torques, Lactococcus, Eubacteroim dolichum, Coprobacillus cateniformis)*.

Uzyskane wyniki, porównania jak i przeprowadzone analizy statystyczne są szczegółowo przedstawione i przedyskutowane w oryginalnej publikacji doktorantki stanowiącą podstawę dysertacji.

Podsumowując tę część pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie użyte metody charakteryzuje wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane analizy statystyczne nie budzą zastrzeżeń. Przekonuje ona, że wszystkie doświadczenia przeprowadzone zostały ze skrupulatnością i obejmuje założone aspekty prowadzonych badań.

Zaprezentowane przez doktorantkę forma dysertacji, opierająca się na cyklu trzech publikacji, sposób ich prezentacji i wykorzystania w dysertacji jest przemyślany. Co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań. A zawarte w powyższych artykułach dyskusje w sposób przejrzysty, ciekawy, merytoryczny, transparentny i nie pozostawiający cienia wątpliwości na znajomości problemu prezentowanego przez autorkę. Jednocześnie w sposób ciekawy i unikalny konfrontuje własne wyniki badań z renomowanymi ośrodkami na świecie. Powyższe wyniki są unikalne i pokazujące nowy trend w diagnostyce i klinice obszaru diabetologii, otwierając nowe możliwości terapeutyczne w bliskiej przyszłości.

Wyrazem powyższych analiz jest przedstawienie, trzech precyzyjnie i w pełni zasadnych wniosków zaproponowane przez Doktorantkę podsumowujące powyższą pracę. Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktoranta celów dysertacji.

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

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska lek. med. Sandry Morozińskiej pod każdym względem spełnia wymogi stawiane dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo dane na temat oceny jakości, ilości oraz interakcji mikroflory jelitowej z różnymi formami cukrzyc, przedstawiając powyższe problemy w sposób unikalny i nowatorski.

Dysertacja została przygotowana w sposób właściwy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Drobne uwagi, jakie posiadam do przedstawionej pracy są natury edytorskiej –np. nazwy genów piszemy kursywą. Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów stylistycznych, natury językowej i tzw. literówek, które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia dla jakości i rangi pracy.

Niepodważalne znaczenie dla wartości pracy – którą pod względem merytorycznym oceniam bardzo wysoko miała by kontynuacja dalszych badań na znacznie większym materiale klinicznym i większą różnorodnością form cukrzyc np. PNDM, *GCK*-MODY czy *INS*-MODY.
Jako Recenzent mam pytanie do Doktorantki czy identyfikacja mikrobiomu w niedalekiej przyszłości stanie się standardowym elementem diagnostyki..?! czy tez celowanej terapii..?! a może prewencji..??! w grupie chorych na cukrzyce??

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska lek. med. Sandry Morozińskiej zatytułowana **„Jakościowe i ilościowe parametry jelitowej flory bakteryjnej u chorych z mono- i wielogenowymi formami cukrzycy**." 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, ze względu na bardzo duży walor aplikacyjny, oraz nowatorski zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lek. med. Sandry Morozińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Jednocześnie wnioskując o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą Rektorską**, ze względu na jej nowatorski i unikalny charakter poznawczy, wpływ na dyscyplinę w obszarze diagnostyki i potencjalnych terapii.

Kierownik
Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

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