

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej



Mgr Beata Kowalewska

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

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Katarzyna Zorena,
prof. nadzw. GUMed

Promotor pomocniczy – dr n. fiz. Piotr Wąż

Gdańsk, 2017

Podziękowania

Pani dr hab. **Katarzynie Zorena**, prof. nadzw. GUMed - promotorowi mojej pracy doktorskiej składam serdeczne podziękowania za życzliwość i wyrozumiałość, poświęcony czas oraz opiekę naukową i nieocenioną pomoc, cenne wskazówki i uwagi przy realizacji niniejszej pracy.

Panu dr **Piotrowi Wąż** - promotorowi pomocniczemu mojej pracy doktorskiej, bardzo dziękuję za owocną współpracę, życzliwość i wsparcie, pomoc w przeprowadzeniu oraz interpretacji analiz statystycznych.

Dr n. med. **Małgorzacie Szmigiero-Kawko** za owocną współpracę, życzliwość oraz umożliwienie zebrania materiału do badań.

Prof. dr hab. n. med. **Małgorzacie Myśliwiec** – Kierownikowi Katedry i Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Dziecięcej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, za życzliwość oraz wyrażenie zgody na współpracę.

Niniejszą rozprawę doktorską

dedykuję mojej **Rodzinie-**

Dziękuję za wyrozumiałość, cierpliwość
i wszechstronne wsparcie w czasie pisania pracy.

Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w pracy	4
Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	5
I. Wprowadzenie	6
1. Cukrzyca.....	6
1.1. Definicja cukrzycy	6
1.2. Patogeneza cukrzycy1	6
2. Grzyby z rodzaju <i>Candida</i>	10
2.1. Charakterystyka grzybów z rodzaju <i>Candida</i> występujących w układzie pokarmowym człowieka.....	10
2.2. Mechanizmy obronne w zakażeniach grzybiczych przewodu pokarmowego	11
2.3. Obecność grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym u dzieci chorujących na cukrzycę typu 1	13
II. Cele pracy	15
III. Pacjenci i metody	16
IV. Metody statystyczne	20
V. Najważniejsze spostrzeżenia prezentowanych publikacji	21
VI. Wnioski końcowe	35
VII. Piśmiennictwo	36
VIII. Streszczenie w jęz. polskim	46
IX. Streszczenie w jęz. angielskim	51
X. Publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej	55
XI. Oświadczenia współautorów	88

Wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w pracy

ADA - American Diabetes Association - Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne

APC- antigen-presenting cell - komórki prezentujące antygen

BMI - body mass index - wskaźnik masy ciała

CRP – C-Reactive Protein, białko C-reaktywne

DBP – diastolic blood pressure- ciśnienie rozkurczowe krwi

DC - dendritic cell – komórki dendrytyczne

DM- diabetes mellitus- cukrzyca

HbA1c - glycated hemoglobin -hemoglobina glikowana

HDL - high density lipoprotein - frakcja lipoproteiny osocza krwi o wysokiej gęstości

HLA- human leukocytes antigens – ludzkie antygeny leukocytarne

IDDM – insulin-dependent diabetes mellitus - cukrzyca insulinozależna

IL- interleukine- interleukina

IL-2,4, 10,12 - interleukina –odpowiednio 2,4, 10 , 12

LDL- low density lipoprotein – frakcja lipoprotein osocza o niskiej gęstości

NK - natural killer – komórki naturalni zabójcy

NOD- Non-obese diabetic mice-nieotyłe myszy cukrzycowe(zwierzęcy model cukrzycy typu 1)

SBP - systolic blood pressure- ciśnienie skurczowe krwi

Th0 , Th1 , Th2 - Type T helper - Limfocyty T pomocnicze subpopulacja 0, 1, 2

TNF α - tumor necrosis factor alpha- czynnik martwicy nowotworu alfa

T1DM- diabetes mellitus type 1- cukrzyca typu 1

T2DM- diabetes mellitus type 2- cukrzyca typu 2

VEGF- vascular endothelial growth factor- naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

WHO - World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

- I. **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 pogładowa
Punktacja MNiSW: 8 pkt.
- II. **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
- III. **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
- IV. 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

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

I. Wprowadzenie

1. Cukrzyca typu 1

1.1. Definicja cukrzycy

Według definicji przyjętej w 1999 roku przez WHO mianem cukrzycy (DM *diabetes mellitus*) określa się grupę chorób metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią wynikającą z defektu wydzielania i/lub działania insuliny. Przewlekła hiperglikemia w cukrzycy wiąże się z uszkodzeniem, zaburzeniem funkcji oraz niewydolnością narządów w tym oczu, nerek, nerwów obwodowych, serca oraz naczyń krwionośnych. Cukrzyca typu 1 (T1DM) jest chorobą autoimmunizacyjną o wieloczynnikowej etiologii, której istotą jest brak lub znaczny niedobór insuliny, spowodowany zniszczeniem komórek β wysp trzustki. Objawy kliniczne cukrzycy pojawiają się dopiero przy uszkodzeniu ponad 90% komórek β [1,2]. 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 przedstawiona 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 [3]. Teoria zakłada, że proces niszczenia komórek β jest wynikiem równoczesnego oddziaływania czynników genetycznych (geny związane zarówno z układem immunologicznym, jak i geny warunkujące „odporność” komórek β na destrukcję) oraz czynników środowiskowych [2,4]. Cukrzyca typu 1 to ok. 8% wszystkich zachorowań i niemalże w 90 % dotyczy dzieci oraz osób młodych przed 30-tym rokiem życia [5]. W Polsce obecnie choruje około 20 tysięcy osób poniżej osiemnastego roku życia, a w każdym kolejnym roku odnotowuje się około 1,5 tysiąca nowych zachorowań [6].

1.2 Patogeneza cukrzycy 1

Czynniki genetyczne cukrzycy typu 1

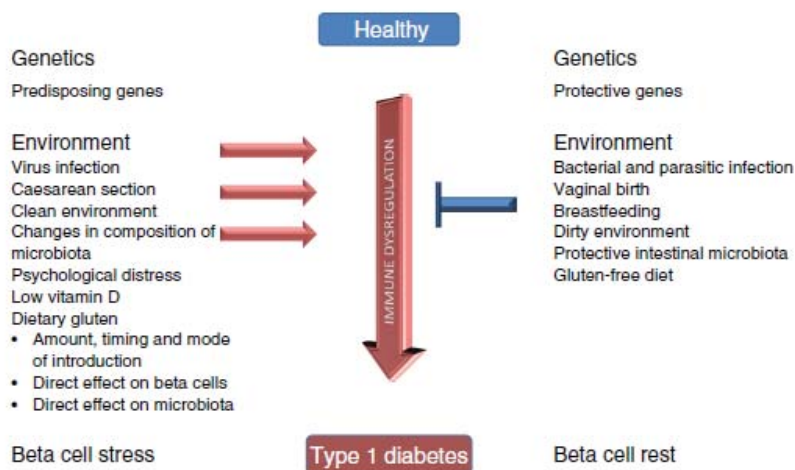
Ryzyko zachorowania związane jest z predyspozycją genetyczną do rozwoju cukrzycy. Podatność na T1DM jest dziedziczna, jednak sposób dziedziczenia jest złożony i wciąż jest wiele niejasności [7]. Uważa się, że kluczową rolę w

warunkowaniu ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 odgrywa region kodujący antygeny głównego układu zgodności tkankowej HLA (human leukocytes antigens) na chromosomie 6. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że allele II klasy HLA odpowiadają w przybliżeniu za około 35–50% ryzyka genetycznego chorych na cukrzycę typu 1. Analiza ludzkiego genomu techniką mapowania umożliwiła również wskazanie innych miejsc przypisanych występowaniu T1DM. Z podatnością na cukrzycę typu 1 powiązano przynajmniej 20 różnych regionów chromosomowych [7].

Wśród dzieci i młodzieży cukrzyca typu 1 jest najczęściej diagnozowaną postacią cukrzycy, niemniej w tej grupie wiekowej coraz większego znaczenia nabiera identyfikacja form monogenowych [8]. Jednym z kryteriów pozwalającym różnicować cukrzycę monogenową od typu 1 jest brak autoimmunologicznych wykładników procesu destrukcji komórek β trzustki w postaci przeciwciał przeciw antygenom komórek β u pacjentów z monogenowymi postaciami choroby [9]. Jednak definitywne postawienie diagnozy cukrzycy monogenowej jest możliwe wyłącznie na podstawie wyniku badań molekularnych. Zgodnie z powszechnie przyjętą klasyfikacją wyodrębnione zostały dwa główne typy cukrzycy monogenowych, których podstawowym kryterium podziału jest wiek zachorowania oraz przebieg kliniczny choroby. Wyróżniamy zatem cukrzycę noworodkową (ang. Neonatal diabetes mellitus – NDM) rozpoznawaną przeważnie do 6 miesiąca życia oraz cukrzycę typu MODY (ang. Maturity onset diabetes of the young) charakteryzującą się późniejszym wiekiem zachorowania, najczęściej ujawniającym się do 25 roku życia oraz z reguły łagodniejszym przebiegiem klinicznym [8].

Czynniki środowiskowe cukrzycy typu 1

Coraz więcej danych z badań epidemiologicznych wskazuje, że same uwarunkowania genetyczne nie są wystarczające do wystąpienia cukrzycy typu 1. Z prowadzonych badań wynika, że tylko u stosunkowo niewielkiej ilości osób podatnych genetycznie (ok. 10%) obserwuje się postęp choroby klinicznej. Choroba występuje równocześnie zaledwie u 20-50% bliźniąt monozygotycznych. Wyniki wieloletnich obserwacji potwierdzają istotną rolę czynników środowiskowych w rozwoju cukrzycy typu 1 [10-12]. Proponowany mechanizm ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 przedstawia rycina 1 [13].



Rycina 1. Zaproponowany schemat mechanizmu ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 [13].

Szereg obserwacji i danych z badań epidemiologicznych wskazuje na sezonowość zachorowań na T1DM, które są bardziej powszechne w miesiącach jesienno-zimowych, co z kolei sugeruje udział w rozwoju cukrzycy czynników infekcyjnych [11,12]. Jednym z czynników infekcyjnych wpływających na rozwój cukrzycy są wirusy min. enterowirusy, wirus różyczki, świnki, rotawirusy i wirusy cytomegalii (CMV) [10,11]. Mechanizmy działania wirusów mogą być różne i nie są do końca jasne. Może dochodzić do bezpośredniego zakażenia komórek β trzustki wirusem, co powoduje lizę tych komórek. Infekcja wirusowa może też indukować aktywację limfocytów T w tym komórek autoreaktywnych T skierowanych przeciwko antygenom komórek β . Określone fragmenty białkowe wirusów mogą wykazywać podobieństwo strukturalne do antygenów komórek β (mimikra molekularna) i aktywacja reakcji krzyżowej T lub B może wywoływać zniszczenie komórek β [14]. Liczne badania wskazują większą zapadalność na T1DM w krajach o niższych średnich temperaturach, mniejszej ilości światła dziennego i słonecznych godzin, co powiązано z niedoborem witaminy D₃ [11,12]. Prowadzone badania wykazują fakt, że suplementacja witaminą D₃ w dzieciństwie wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem cukrzycy [15] choć i w tym przypadku istnieją sprzeczne doniesienia [10-12]. Jak wskazuje wiele badań pierwsze oznaki autoimmunizacji komórek β mogą pojawiać się już w pierwszych miesiącach życia [10,12]. Wczesna ekspozycja na obce białka może być czynnikiem który wpływa na reakcje autoimmunologiczne [10,16]. W prowadzonych badaniach analizie poddawany jest zwłaszcza wpływ glutenu oraz mleka krowiego wprowadzanego do

diety we wczesnym dzieciństwie. W wielu publikacjach zwraca się uwagę, że wpływ na rozwój cukrzycy typu 1 może mieć ilość i czas w którym te produkty wprowadzane są do diety. Wyniki niektórych badań sugerują, że wczesne w wieku poniżej 3 miesięcy, wprowadzenie produktów zawierających gluten lub inne zboża do diety wiąże się ze zwiększonym ryzykiem autoimmunizacji wysp trzustkowych [17,13]. Co ciekawe zaobserwowano, że ryzyko rozwoju T1DM zmniejszało się, jeśli produkty zbożowe były wprowadzone do diety w czasie gdy dziecko nadal było karmione piersią [13]. Co więcej wykazano, że eliminacja glutenu z diety może chronić przed rozwojem cukrzycy typu 1. Eliminacja glutenu z diety jest korzystna również poprzez modulowanie składu mikrobiomu jelit [16]. Natomiast większe spożycie mleka krowiego we wczesnym dzieciństwie może zwiększyć ryzyko rozwoju autoimmunologicznej destrukcji komórek β trzustki i progresji do T1DM [17,18]. We wczesnym stadium choroby T1DM spożycie mleka krowiego może mieć większy wpływ u dzieci z niskim / umiarkowanym ryzykiem genetycznym T1DM [18]. Wyniki niektórych badań nie wykazują jednak wpływu wczesnego wprowadzania mleka krowiego czy glutenu do diety niemowląt na zwiększenie ryzyka rozwoju T1DM [19,20]. Według ostatnich badań ważnym elementem przyczyniającym się do rozwoju chorób autoimmunologicznych w tym cukrzycy typu 1 może być zmiana mikroflory jelitowej [12]. Niektórzy badacze sugerują wyraźne różnice w składzie mikrobioty jelitowej osób z cukrzycą w porównaniu do osób zdrowych [21-23].

W zdrowym organizmie ludzkim istnieje równowaga mikroflory jelitowej a zakłócenia homeostazy – dysbioza mają istotny wpływ na reakcje immunologiczne, które zostały obserwowane w różnych jednostkach chorobowych, określanych często jako schorzenia cywilizacyjne. Są to choroby o podłożu alergicznym, autoimmunoagresywnym oraz zaburzeń metabolicznych. W ostatnich latach coraz bardziej wzrasta zainteresowanie wpływem mikroflory jelitowej na stan równowagi zdrowotnej człowieka. Coraz więcej dowodów wskazuje, że mikroorganizmy jelitowe mogą być zaangażowane w patogenezę cukrzycy typu 1 [21,24,25]. Grzyby drożdżopodobne podobnie jak bakterie i wirusy wchodzi w skład mikroflory jelitowej. W kontekście całego mikrobiomu jelit, grzyby drożdżopodobne są ogólnie uważane za składnik nieliczny, stanowią około 0,1% mikroorganizmów jelitowych [26]. Jednak pomimo, iż grzyby stanowią niewielki procent mikrobioty jelit, zmiana w ich ilości wpływa na skład flory bakterii zaburzając równowagę flory jelitowej. Dysbioza natomiast wydaje się zwiększać przepuszczalność jelit, a tym samym wspierać rozwój nisz prozapalnych, które stymulują autoagresję

komórek β u predysponowanych pacjentów [27]. W prowadzonych badaniach dotyczących mikrobioty jelit wykazano różnice w składzie bakterii obserwowanych u osób z cukrzycą typu 1 w porównaniu do osób zdrowych. Pacjenci z T1D wykazują mniej zróżnicowany i mniej stabilny mikrobiom jelit w porównaniu z osobami zdrowymi [28,29]. Zwiększona kolonizacja grzybami drożdżopodobnymi np. po stosowaniu antybiotyków, po rozwoju infekcji może prowadzić do zakłócenia równowagi ekologicznej flory jelitowej, może sprzyjać rozwojowi niekorzystnych szczepów bakterii i prowadzić do spadku poziomu gatunków pożytecznych bakterii, może przyczynić się do takich zmian we florze bakteryjnej które mają wpływ na rozwój cukrzycy typu 1 [30].

W pierwszej publikacji stanowiącej cykl prac rozprawy doktorskiej „Grzyby drożdżopodobne w układzie pokarmowym u dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. **Beata Kowalewska**, Małgorzata Kawko, Katarzyna Zorena, Małgorzata Myśliwiec. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2014;22(4):170-177 dokonano przeglądu piśmiennictwa w dostępnych bazach internetowych z ostatnich lat związanych z występowaniem grzybów drożdżopodobnych u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1.

2 Grzyby z rodzaju *Candida*

2.1. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Candida* występujących w układzie pokarmowym człowieka

W warunkach fizjologicznych grzyby z rodzaju *Candida* występując w niewielkiej ilości komórek wchodzi w skład naturalnej mikroflory ludzkiego organizmu, kolonizując błony śluzowe jamy ustnej, przewodu pokarmowego, dróg rodnych kobiet [31]. Obecnie znanych jest ok. 200 gatunków grzybów z rodzaju *Candida*, z czego na podstawie wieloletnich badań za patogenne uznaje się co najmniej 15 gatunków: *C.albicans*, *C. catenulata*, *C.dublinskiensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*. Gatunkiem najczęściej izolowanym z różnych ontocenoz jest *Candida albicans* [32,33]. Od wielu lat prowadzone są badania nad inwazyjnością grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*, jednak nadal określenie w którym momencie kończy się nosicielstwo a zaczyna inwazja, kiedy

należy stosować profilaktykę przeciwgrzybiczą nie jest rozstrzygnięte. W zdrowym organizmie ludzkim, przy prawidłowo działających mechanizmach obronnych nie dochodzi do rozwoju zakażenia grzybiczego. Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* zachowują się jak symbiotyczny składnik mikroflory przewodu pokarmowego [33-35]. Natomiast pojawienie się czynnika, który umożliwia zwiększenie liczby komórek grzyba zapoczątkowując ich penetrację w głąb tkanki może doprowadzić do rozwoju objawowej kandydozy [36]. Infekcje grzybami z rodzaju *Candida* mogą wystąpić w konsekwencji zakłócenia mechanizmów obronnych gospodarza: naruszenia równowagi fizjologicznej mikroflory jelitowej, zaburzenia układu odpornościowego, uszkodzeń śluzówki [33,35,37] oraz zmian w ekspresji genów powodujących wirulencję w uprzednio komensalnych szczepach *Candida* [34,38-41]. Zdolność *C. albicans* oraz innych gatunków z rodzaju *Candida* do szybkiej adaptacji, kolonizowania i przetrwania w różnych anatomicznych niszach organizmu gospodarza uczyniła je bardziej szkodliwymi niż inne komensale organizmu ludzkiego [42,43].

2.2. Mechanizmy obronne w zakażeniach grzybiczych przewodu pokarmowego

Patogeneza zakażenia grzybami z rodzaju *Candida* jest złożonym procesem, który zależy od wzajemnej interakcji grzyb-gospodarz [44]. Jest szczególnie istotne, że ludzki układ odpornościowy jest w stanie rozróżniać między kolonizacją i patogenną fazą inwazji *C.albicans* [45,46]. Czy ekspozycja na *Candida* będzie tolerowana czy też rozwinie się infekcja zależy w dużej mierze od odporności gospodarza. Z jednej strony grzyby drożdżopodobne posiadają cechy umożliwiające im inwazję do organizmu gospodarza - od pokonania naturalnych barier ochronnych poprzez kolonizację do infekcji. Patogenność grzybów drożdżopodobnych zależy między innymi od zdolności przylegania, produkcji toksyn i enzymów, dimorfizmu, zmienności fenotypowej czy też mimikry molekularnej. Adherencja (zdolność przylegania) grzybów drożdżopodobnych, stanowi wstępny etap zasiedlenia przez komórki grzyba określonych tkanek żywiciela i rozpoczyna proces inwazji w głąb tkanek gospodarza. Proces adhezji grzybów jest złożony i aktywowany jest poprzez substancje białkowe występujące w ścianie komórkowej zwane adhezynami, są to min. białka Als1-Als9. Białka Als biorą udział w interakcjach między komórkami grzyba i gospodarza, różnią się funkcją i rozmiarem [42,47]. Grzyby *Candida* wytwarzają także enzymy wspomagające inwazje i rozprzestrzenianie się w tkankach żywiciela. Umożliwia to penetrację tkanek oraz

trawienie komórek odpornościowych i przeciwciał, a zwiększona aktywność enzymatyczna koreluje ze zwiększoną wirulencją szczepu. Największą rolę w patogenezie *Candida* odgrywają proteazy i fosfolipazy [36,42,47]. Ważnym czynnikiem wirulencji jest zmienność morfologiczna. Najczęstszy patogen *C.albicans* może występować w dwu postaciach (dimorfizm): drożdżowej (blastospori) i nitkowatej (mycelialnej- strzępki). Zmiany morfologii decydują o różnych właściwościach adhezyjnych i patogennych obu form grzyba. Wczesne stadia infekcji związane są z formą drożdżową - posiadającą w ścianie białka biorące udział w rozpoznawaniu komórek gospodarza oraz bardziej odporną na działanie fagocytów, później zaś pojawiają się formy mycelialne, łatwiej wnikające w głąb tkanki, umożliwiając jej zajęcie [33,42, 45,47]. Zmienność fenotypowa grzybów z rodzaju *Candida* polegająca na występowaniu w obrębie gatunku różnych fenotypów różniących się właściwościami biochemicznymi, zdolnościami adhezyjnymi, produkcją enzymów i toksyn, odpornością na leki, pozwala drożdżakom omijać obronę gospodarza [43]. Z drugiej strony w odpowiedzi na obecność antygenów grzybów drożdżopodobnych organizmie uruchamiane są kolejno ściśle powiązane ze sobą mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Ich efektywność zależy od współdziałania wrodzonej i nabytej odporności organizmu [48,49]. Rodzaj i natężenie odpowiedzi immunologicznej zależne są od rodzaju infekcji i ich nasilenia. Istotną funkcję w procesach obrony przed zakażeniem *Candida* pełnią mechanizmy odporności związane ze swoistą odpowiedzią komórkową, w której ważną rolę odgrywają limfocyty T oraz odpowiadające za odporność nieswoistą neutrofile, monocyty oraz makrofagi fagocytujące komórki drożdżaków. W badaniach *in vitro* wykazano, że w odpowiedzi na antygeny *Candida* dochodzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu Th1, charakteryzującej się zwiększeniem produkcji interleukiny 2 (IL-2) oraz interferonu gamma (IFN- γ), przy niskim stężeniu interleukiny 4 (IL-4) oraz interleukiny 10 (IL-10) [50,51]. W zakażeniach systemowych istotna jest odporność komórkowa ze szczególnym udziałem makrofagów i fagocytozy, podczas gdy w zakażeniach błon śluzowych ważne znaczenie w ochronie mają limfocyty CD4. Mechanizmy eliminacji komórek patogenu muszą być dokładnie regulowane, aby zapobiec uszkodzeniu narządu lub tkanki [52].

2.3. Obecność grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowych u dzieci chorujących na cukrzycę typu 1

W ciągu ostatnich lat wzrasta częstość występowania grzybic, zarówno powierzchniowych jak i systemowych [31,53]. Z obserwacji klinicznych wynika, że nawracające zakażenia grzybami drożdżopodobnymi są częstym problemem chorych na cukrzycę. U pacjentów z T1DM jak też typu 2 (T2DM) szereg czynników może mieć wpływ na rozwój kandydozy. Zwiększona glikemia, zaburzona równowaga układu immunologicznego może sprzyjać namnażaniu się grzybów [54-56]. Autorzy licznych prac stwierdzają fakt, iż u pacjentów z cukrzycą grzyby z rodzaju *Candida* częściej zasiedlają jamę ustną niż u ludzi zdrowych [57-59]. Większą ilość grzybów drożdżopodobnych zaobserwowano również u pacjentów z cukrzycą typu 1 w porównaniu do pacjentów z cukrzycą typu 2 [57]. Jednak istnieją prace w których autorzy nie wykryli istotnych różnic w ilości grzybów drożdżopodobnych *Candida* u pacjentów z cukrzycą typu 1 jak też typu 2 w odniesieniu do grupy kontrolnej [55]. W badanych grupach pacjentów z cukrzycą typu 1 jak też typu 2 najczęściej stwierdzanym gatunkiem był *Candida albicans*. W badaniach porównujących występowanie grzybów drożdżopodobnych w grupie dzieci i osób dorosłych stwierdzono, że u pacjentów dorosłych mimo, że *C. albicans* dominował, to inne gatunki *Candida* były częstsze niż u dzieci [60]. Autorzy pracy Cisło i wsp. wykazali obecność grzybów drożdżopodobnych w kale u 91% dzieci z cukrzycą typu 1, natomiast w popłuczynach z jamy ustnej u 92.5% dzieci. Z kolei u dzieci zdrowych grzyby drożdżopodobne wyhodowano odpowiednio u 66.5% w kale i 61% w jamie ustnej [61]. W innych badaniach dotyczących flory bakteryjnej i grzybiczej, grzyby drożdżopodobne wykryto tylko w 44,6% dzieci z cukrzycą typu 1. Materiał stanowiły mocz, wymazy z jamy ustnej i gardła oraz okolic cewki moczowej lub przedsionka pochwy [62]. W badaniach obejmujących grupy dzieci z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego jak też astmy u 70-83% dzieci stwierdzano grzyby drożdżopodobne w układzie pokarmowym [63,64].

Masywny wzrost grzybów drożdżopodobnych obserwowany u pacjentów może wpływać niekorzystnie na przebieg cukrzycy - trudności z wyrównaniem metabolicznym, zwiększenie zapotrzebowania na insulinę, jak też prowadzić do trudnych do wyleczenia zakażeń objawowych. 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 nieliczne wyniki badań są rozbieżne.

II. Cel pracy

Celem pracy była ocena jakościowa i ilościowa grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych.

Cel główny realizowano poprzez cele szczegółowe:

- Charakterystyka szczepów grzybów z rodzaju *Candida* zasiedlających przewód pokarmowy dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 pod względem wybranych cech fenotypowych z uwzględnieniem lekooporności.
- Analiza surowiczego stężenia interleukiny 12 (IL12) w kontekście wyrównana metabolicznego oraz obecności grzybów drożdżopodobnych w układzie pokarmowym dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1
- Ocena poziomu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w odniesieniu do gospodarki lipidowej oraz ilości grzybów drożdżopodobnych zasiedlających przewód pokarmowy dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

III. Pacjenci i metody

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. Kliniką Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku kieruje prof. dr hab. n. med. Małgorzata Myśliwiec. Cukrzycę typu 1 rozpoznawano na podstawie wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego, które jest zgodne z zaleceniami WHO. Wszyscy pacjenci byli w trakcie intensywnego leczenia insuliną (0.89 ± 0.21 IU insuliny na dzień/kg masy ciała). Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniono na podstawie stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c) oznaczonego w surowicy metodą immunoturbidymetryczną używając Unimate 3 set (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Szwajcaria). Poziom białka C-reaktywnego (CRP) oznaczono wysokoczułym testem ELISA (HsCRP firmy Dade Behring, USA). U wszystkich pacjentów oceniono dobowe wydalanie albumin w moczu metodą immunoturbidymetryczną przy użyciu testu Tina-quant® (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). Jako albuminurię określono wydalanie albumin w moczu w granicach 30-299 mg/dobę w dwóch spośród trzech dobowych próbek jałowego moczu, zebranego na przestrzeni 6 miesięcy od chorych z wyrównaną cukrzycą bez cech klinicznych i laboratoryjnych kwasicy ketonowej. Ponadto wykonano 24-godzinny pomiar ciśnienia tętniczego metodą Holtera (ABPM). Średnie wartości ciśnienia tętniczego oceniono w oparciu o siatki centylowe. Stężenie cholesterolu całkowitego, jego frakcji LDL i HDL- oceniono przy użyciu analizatorów ARCHITECT System i AEROSSET Abbott, Wiesbaden, Germany. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych dzieci i młodzieży (16 dziewcząt oraz 14 chłopców, zakres wieku 10.3 +/- 4.9 lat).

Material

Materiał do badań w kierunku obecności grzybów drożdżopodobnych stanowił kał, który pobierano do jałowych pojemników i dostarczano do laboratorium przez rodziców badanych dzieci lub prawnych opiekunów w dniu pobrania. Z dostarczonego materiału w tym samym dniu zakładano hodowle w kierunku obecności grzybów

drożdżopodobnych. Dzieci i młodzież z T1DM oraz badana grupa kontrolna w dniu dostarczenia próbek kału były badane przez lekarza pediatrę/diabetologa, który przeprowadził badanie fizykalne oraz podmiotowe. Na podstawie wywiadu w badanych grupach dzieci nie stwierdzono żadnych dolegliwości związanych z układem pokarmowym oraz co najmniej 3 miesiące przed badaniem grupa dzieci i młodzieży z T1DM jak też grupa dzieci zdrowych nie była leczona antybiotykami. Od wszystkich badanych dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 oraz zdrowej grupy kontrolnej pobrano 2 ml krwi żyłnej do probówek nie zawierających koagulantu. Wszystkie pobrania wykonano przy okazji innych badań biochemicznych. Następnie krew poddano wirowaniu przy prędkości 2500 obrotów/min przez 15 minut. Uzyskane surowice zamrożono i przechowywano do dalszej analizy w temperaturze – 80°C.

Metody

Hodowla grzybów drożdżopodobnych

W celu wyizolowania oraz określenia liczby kolonii grzybów drożdżopodobnych w 1 gramie kału zastosowano posiew ilościowy na podłożu Sabourauda (Sabouraud Dextrose Agar). Przygotowywano zawiesiny kału w soli fizjologicznej w kolejnych rozcieńczeniach 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Na płytce z podłożem Sabourauda - zaznaczano 5 linii posiewu. Na pierwszej linii równomiernie rozprowadzano 10 µg kału na następne kolejno nanoszono i równomiernie rozprowadzano po 10 µl poszczególnych roztworów zawiesin kału. Hodowle inkubowano przez 72 godziny w cieplarni w temperaturze 37°C. Następnie liczono liczbę kolonii grzybów które wyrosły na płytce i uwzględniając rozcieńczenia przeliczano na liczbę kolonii grzybów (CFU) w 1 gramie badanego kału. Przyjęto wartości wzrostu $10^3 - 10^6$ 1g/CFU. W celu rozpoznania czy w badanym materiale występuje więcej niż jeden gatunek *Candida* kał posiewano dodatkowo na podłożu CHROMagar (Graso, Polska). Identyfikacje wyhodowanych grzybów prowadzono na podstawie cech morfologicznych i właściwości biochemicznych określanych przy zastosowaniu gotowych testów API 20 C AUX (BioMerieux, Francja) wg zaleceń producenta.

Ocena wrażliwości grzybów drożdżopodobnych na leki przeciwgrzybiczne

Ocenę wrażliwości na leki wyizolowanych szczepów przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu FUNGITEST® (BIO-RAD, Francja) służącego do badania wzrostu grzybów drożdżopodobnych w obecności sześciu leków w dwóch stężeniach – 5-fluorocytozyny (5FC) (2.0 i 32.0 µg/ml), amfoterycyny B (AB) (2.0 i 8.0 µg/ml), mikonazolu (MCZ) (0.5 i 8.0 µg/ml), ketokonazolu (KET) (0.5 i 4.0 µg/ml), itrakonazolu (ITR) (0.5 i 4.0 µg / ml), i flukonazolu (FLU) (8.0 i 64.0 µg/ml). Badanie przeprowadzono wg. zaleceń producenta.

Badanie aktywności enzymatycznej

Aktywność enzymatyczną wyhodowanych szczepów określano za pomocą testów API ZYM (BioMerieux, Francja) zgodnie z zaleceniami producenta. Test API ZYM zawiera substraty do wykrycia aktywności 19 hydrolaz.

Immunoenzymatyczne oznaczenie przeciwciał *C. albicans* w klasie IgG oraz IgM w surowicy krwi dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 oraz w zdrowej grupie kontrolnej

Oznaczenie przeciwciał w klasie IgG i IgM *C.albicans* wykonano przy użyciu komercyjnych testów ELISA firmy DRG Instruments GmbH, D-35039 Marburg, Germany według instrukcji podanej przez producenta. Odczytu pomiaru absorbancji dokonano przy pomocy czytnika ChroMate 4300 (Awareness Technology, Inc. USA) przy długości fali $\lambda=450$ nm.

Wyniki pomiaru absorpcji przeciwciał *C.albicans* w klasie IgG i IgM obliczono wg. wzoru i podano w jednostkach DRG (DU) zgodnie z zaleceniem producenta testu.

$$\frac{\text{wartość absorbancji pacjenta} \times 10}{\text{wartość absorbancji cut off}} = \text{DU}$$

Otrzymane wyniki przeciwciał *C.albicans* w klasie IgG i IgM < 9DU przyjęto jako negatywne. Wartości między 9-11 DU stanowią tzw. szarą strefę czyli wynik wątpliwy. Natomiast wartości przeciwciał *C.albicans* w klasie IgG i IgM >11DU przyjęto jako wynik pozytywny.

Badanie poziomu interleukiny 12 (IL12) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w surowicy krwi w badanych grupach dzieci i młodzieży

Stężenie IL-12 oraz VEGF w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu zestawu Quantikine® firmy R&D Systems (USA), według instrukcji podanej przez producenta. Odczytu pomiaru absorbancji dokonano przy pomocy czytnika ChroMate 4300 (Awareness Technology, Inc. USA) przy długości fali $\lambda=450$ nm.

Na realizację badań dotyczących tematu mojego przewodu doktorskiego uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej d/s Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/125/2014).

IV. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu RKWard Data Analysis Tool Version 0.6.1 using KDE Development Platform 4.13.3. Zmienne ilościowe zostały scharakteryzowane za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. Natomiast zmienne typu jakościowego zostały przedstawione za pomocą licznosci oraz wartości procentowych. Do sprawdzenia, czy zmienna ilościowa pochodziła z populacji o rozkładzie normalnym posłużono się testem W Shapiro-Wilka. W przypadku gdy nie było podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej testu Shapiro-Wilka badano różnice między średnimi zbiorów testem t-studenta po uprzednim sprawdzeniu jednorodności wariancji testem F-Snedecora. W pozostałych przypadkach użyto testu Wilcoxon/U-Manna-Whitneya. Dla większej grupy danych analizę wariancji wykonano testem Bartletta (rozwińcie testu F-Snedecora na większą liczbę prób). W przypadku wykrycia niejednorodności wariancji, różnice pomiędzy grupami badano stosując test Kruskala-Wallisa. Dla grup z jednorodną wariancją zastosowano test ANOVA. W celu stwierdzenia powiązania siły oraz kierunku między dwiema zmiennymi zastosowano analizę korelacji obliczając współczynniki korelacji Pearsona i Spearmana. Do analizy wpływu kilku zmiennych niezależnych na zmienną zależną typu mierzalnego posłużono się regresją wieloraką. W celu zbadania wpływu ilości grzybów drożdżopodobnych na wybrane parametry kliniczne zastosowano analizę wariancji (ANOVA) dla klasyfikacji podwójnej. W następnym etapie zastosowano algorytm krokowy z kryterium AIC (Akaike Information Criterion) w celu znalezienia optymalnej grupy zmiennych niezależnych. Prawdopodobieństwo testowe P lub inaczej graniczny poziom istotności ustalono jako wartość 0.05.

V. Najważniejsze spostrzeżenia publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej

W pierwszym etapie badań, które przedstawiłam w oryginalnej pracy "*Higher diversity in fungal species discriminates children with type 1 diabetes mellitus from healthy control*". Kowalewska B, Zorena K, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. *Patient Prefer Adherence*. 2016 Apr 21;10:591-9. doi: 10.2147/PPA.S97852, badano ilościowo oraz jakościowo grzyby drożdżopodobne w kale u dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 (T1DM). Określano częstość występowania kolonii grzybów drożdżopodobnych w kale, ich ilość, zróżnicowanie gatunkowe, wrażliwość na leki oraz oznaczono aktywność enzymatyczną.

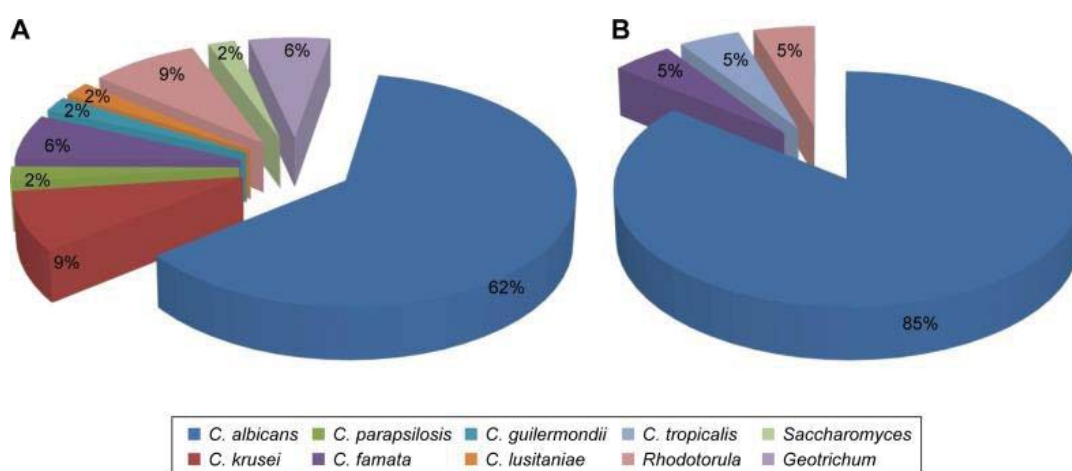
Przebadano 53 dzieci z T1DM oraz 30 zdrowych dzieci. W próbkach kału u 13/53 pacjentów z T1DM oraz 9/30 z grupy kontrolnej nie wyhodowano grzybów drożdżopodobnych. Natomiast w próbkach kału od 40 pacjentów z T1DM wykryto wzrost grzybów drożdżopodobnych w ilości 10^3 - 10^6 CFU/g kału. Wśród 40 dzieci z T1DM u których wyhodowano grzyby u 33 osób (82.5%) wyhodowano pojedyncze gatunki grzybów drożdżopodobnych (otrzymano hodowle jednogatunkowe) natomiast w próbkach kału od 7 (17.5%) osób wyhodowano równocześnie po dwa różne gatunki grzybów drożdżopodobnych. W dodatkich próbkach kału od dzieci z T1DM otrzymano łącznie 47 szczepów grzybów drożdżopodobnych. Wyhodowane szczepy należały do 9 gatunków. Gatunki z rodzaju *Candida* stanowiły 83% wyizolowanych szczepów, a pozostałe 17% stanowiły inne grzyby drożdżopodobne. Wśród otrzymanych szczepów dominował gatunek *Candida albicans* który stanowił 62% wszystkich wyhodowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych. Inne otrzymane gatunki z rodzaju *Candida* to *C. krusei* - 9 % wszystkich grzybów, *C. famata* odpowiednio 6%, *C. parapsilosis* , *C. lusitaniae*, *C. guilhermondii* stanowiące każdy 2% wszystkich izolowanych w hodowli grzybów. Pozostałe izolowane gatunki grzybów drożdżopodobnych to gatunki z rodzaju *Rhodotorula* 9%, *Geotrichum* 6%, *Saccharomyces* 2% [Ryc.2A].

W zdrowej grupie kontrolnej u 21/30 badanych dzieci wykryto obecność grzybów drożdżopodobnych w ilości 10^3 - 10^6 CFU/g kału. W 21 próbach kału wykryto 21 szczepów grzybów drożdżopodobnych, które należały do 4 gatunków. Wśród otrzymanych szczepów dominował gatunek *Candida albicans*, który stanowił 85%

wszystkich wyhodowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych. Ponadto w badanej grupie wykryto *C. famata* i *C. tropicalis*, które stanowiły 5% wszystkich grzybów. Ostatnim wykrytym w ilości 5% był gatunek z rodzaju *Rhodotorula* sp nie należący do rodzaju *Candida* [Ryc.2B].

Rycina 2. Ilość gatunków grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych z próbek kału u dzieci z T1DM (A) oraz w grupie kontrolnej (B).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844445/figure/f1-ppa-10-591/>



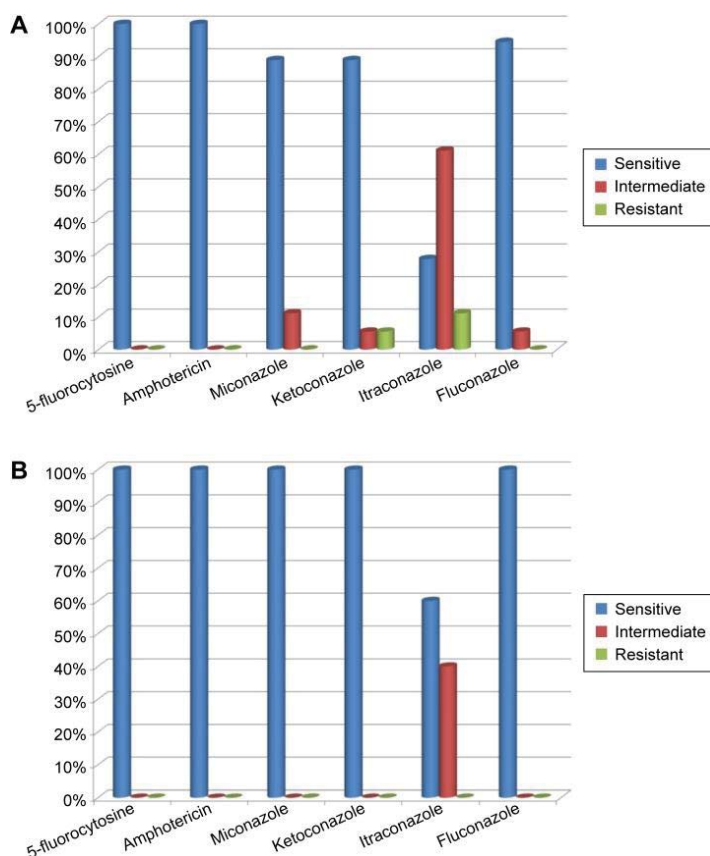
U dzieci i młodzieży chorujących na T1DM zaobserwowano większe zróżnicowanie wyhodowanych gatunków grzybów drożdżopodobnych. W grupie dzieci z T1DM jak i wśród dzieci z grupy kontrolnej dominował gatunek *C. albicans*. Jednakże u dzieci z cukrzycą typu 1 gatunek *C. albicans* stanowił tylko 62% wszystkich wyhodowanych grzybów drożdżopodobnych natomiast u dzieci z grupy kontrolnej gatunek *C. albicans* stanowił 85% wszystkich wyhodowanych grzybów drożdżopodobnych.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono ocenę lekowrażliwości izolowanych grzybów *C. albicans* w odniesieniu do 6 leków przeciwgrzybiczych używając FUNGITEST (Bio-Rad): 5fluorocytozyna, amfoterycyna, mikonazol, ketokonazol, itraconazol, flukonazol. W grupie dzieci z T1DM oraz w grupie kontrolnej 100% wyhodowanych z próbek kału szczepów *C. albicans* było wrażliwych na 5fluorocytozynę i amfoterycynę. Natomiast tylko 28% szczepów grzybów *C. albicans*

było wrażliwych na itraconazol u dzieci z T1DM i 54.5% u dzieci z grupy kontrolnej [Ryc. 3 A, B].

Rycina 3. Ocena lekowrażliwości izolowanych z kału grzybów *Candida albicans* u pacjentów z T1DM (A) oraz w grupie kontrolnej (B).

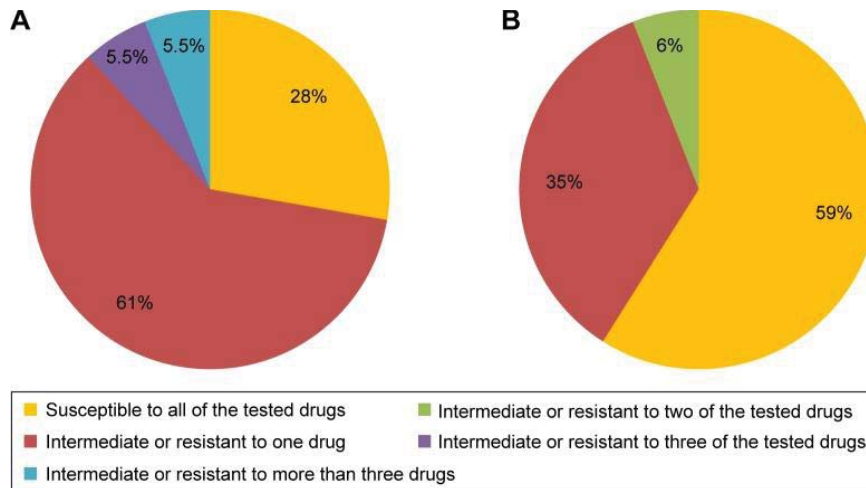
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844445/figure/f3-ppa-10-591/>



Wśród szczepów *C.albicans* wyhodowanych od dzieci z T1DM 28% szczepów było wrażliwych na wszystkie badane leki, 61% szczepów wykazywało średnią wrażliwość lub oporność na jeden z leków (itraconazol), 5.5% szczepów wykazywało wrażliwość na trzy z badanych leków a na pozostałe było średniowrażliwe lub odporne (itraconazol, mikonazol, ketakonazol), 5.5% szczepów było wrażliwych tylko na dwa z badanych leków (5fluorocytozyna i amfoterycyna) [Ryc. 4A]. Wśród szczepów *C.albicans* izolowanych od dzieci zdrowych 59% wykazywało wrażliwość na wszystkie leki, 35% było wrażliwych tylko na 5 leków (średniowrażliwe na itraconazol) a 6% nie wykazywało wrażliwości na dwa z 6 badanych leków (itraconazol, mikonazol) [Ryc. 4B].

Rycina 4. Porównanie ilości szczepów *Candida albicans* wrażliwych i opornych na 6 badanych leków przeciwgrzybiczych u pacjentów z T1DM (A) oraz w grupie kontrolnej (B).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844445/figure/f5-ppa-10-591/>



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). Co więcej niepokojący wydaje się fakt wystąpienia stosunkowo dużej ilości szczepów słabo wrażliwych i opornych na itraconazol oraz mniejszą ilość szczepów wrażliwych na flukonazol i ketakonazol u dzieci z T1DM. W naszych badaniach stwierdzono również występowanie większej ilości szczepów *Candida sp.* o zmniejszonej wrażliwości na badane leki. Fakt wyizolowania z kału dzieci z T1DM coraz większej ilości szczepów o zmniejszonej wrażliwości na stosowane leki może mieć istotne znaczenie w przypadku wystąpienia czynników sprzyjających rozwojowi grzybicy i wpływ na trudności w leczeniu. Ryzyko rozwoju poważnych dolegliwości powiązanych z kandydozą będzie tym większe, im więcej czynników ryzyka wystąpi u pacjenta np. stosowanie antybiotyków ale także im bardziej patogenny będzie szczep wyizolowany od pacjenta z T1DM.

Aktywność enzymów jest jednym z czynników mających wpływ na zjadliwość grzybów drożdżopodobnych. *Candida* wytwarza wiele enzymów mających wpływ na przebieg infekcji. Aktywność enzymatyczna może mieć wpływ na zachwianie równowagi układu grzyb-gospodarz. Wyższa aktywność enzymatyczna szczepów *Candida* wyhodowanych z kału dzieci chorych na T1DM może przemawiać za ich

większą zjadliwością, mogą stanowić również większe zagrożenie w przypadku wystąpienia osłabienia organizmu.

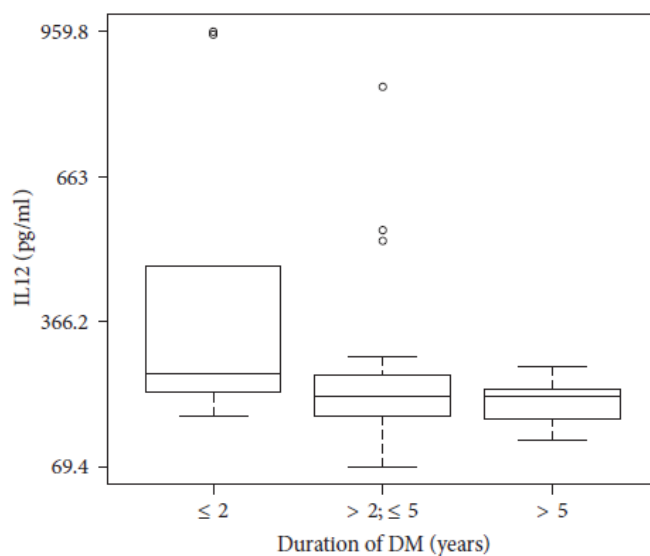
Reasumując, grzyby drożdżopodobne izolowane z kału dzieci z T1DM były bardziej zróżnicowane gatunkowo w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowano większą liczbę szczepów *C. albicans* wyizolowanych z kału dzieci z T1DM, które wykazywały słabszą wrażliwość na badane leki oraz okazały się mieć wyższą aktywność enzymatyczną. W badaniach diagnostycznych należałoby rozważyć wykonywanie badań mikologicznych u dzieci z T1DM, w tym również badań ilościowych grzybów drożdżopodobnych w kale. 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.

W kolejnym etapie pracy badano związek pomiędzy stężeniem IL12 w surowicy krwi a prewalencją grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu. **Kowalewska B**, Zorena K, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. *High interleukin-12 levels may prevent an increase in the amount of fungi in the gastrointestinal tract during the first years of diabetes mellitus type 1*. Dis. Markers. 2016; ID 4685976, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4685976>

Rola interleukiny 12 (IL12) w przebiegu cukrzycy typu 1 nie jest do końca wyjaśniona. W dotychczasowych badaniach wykazano, że IL12 odgrywa istotną rolę w procesie nieodwracalnego niszczenia komórek β wysp trzustkowych i rozwoju T1DM [65-67]. Głównymi producentami IL12 są fagocyty (monocyty / M Φ i neutrofile) oraz komórki dendrytyczne w odpowiedzi na patogeny w tym bakterie, wirusy, pasożyty wewnątrzkomórkowe oraz grzyby drożdżopodobne [68]. IL12 wzmacnia cytotoksyczną aktywność komórek dendrytycznych, kom NK oraz makrofagów przez co z jednej strony zapobiega rozwojowi infekcji grzybiczych zaś z drugiej strony odgrywa istotną rolę w powstawaniu chorób autoimmunologicznych. Ma swój udział w autodestrukcji komórek β wysp trzustkowych przyczyniając się do rozwoju cukrzycy typu 1 [67]. Dotychczas rola IL12 w odporności na rozwój infekcji grzybiczych *C.albicans* została przedstawiona jedynie w eksperymentalnym mysim modelu [69-71]. Natomiast nie znany jest status IL12 w kontekście infekcji grzybów drożdżopodobnych u dzieci i

młodzieży z T1DM. Dlatego też celem naszych badań 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 związku z powyższym badaną grupę dzieci i młodzieży chorujących na T1DM podzielono na trzy grupy: grupę pacjentów z czasem trwania cukrzycy ≤ 2 lat, grupę $>2; \leq 5$ lat oraz grupę pacjentów z czasem trwania T1DM >5 lat. W badanej grupie wykryto wyższe stężenie IL12 w surowicy u dzieci i młodzieży z T1DM z czasem trwania cukrzycy ≤ 2 lat w porównaniu do grupy dzieci z T1DM oraz czasem trwania cukrzycy $>2; \leq 5$ lat jak też w porównaniu z grupą pacjentów u których czas trwania cukrzycy wynosił >5 lat. Natomiast nie wykazano istotnych różnic w stężeniu IL-12 porównując grupę dzieci z czasem trwania cukrzycy $>2; \leq 5$ lat z grupą pacjentów u których czas trwania cukrzycy wynosił >5 lat [Ryc. 5].

Rycina 5. Poziom IL12 w surowicy krwi u dzieci i młodzieży z T1DM/
<https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/4685976/fig2/>



Charakterystyka kliniczna dzieci i młodzieży z T1DM wykazała, że grupa pacjentów z czasem trwania choroby ≤ 2 lat była istotnie statystycznie młodsza w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania cukrzycy $>2; \leq 5$, jak też w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania T1DM >5 lat. Ponadto pacjenci z T1DM z czasem trwania choroby ≤ 2 lat charakteryzowali się istotnie niższym stężeniem HbA1c w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania cukrzycy $>2; \leq 5$ lat, jak też w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania choroby >5 lat. Nie wykryto różnic istotnie statystycznych w zakresie stężenia białka CRP w surowicy u dzieci i młodzieży z

T1DM w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Poza tym u 21% dzieci z T1DM z czasem trwania choroby ≤ 2 wykryto w próbkach kału obecność grzybów drożdżopodobnych w ilości 10^3 - 10^6 CFU/g. Natomiast w grupie pacjentów z czasem trwania cukrzycy >2 ; ≤ 5 obecność grzybów drożdżopodobnych wykryto u 37% dzieci oraz u 42% pacjentów z czasem trwania cukrzycy >5 . Charakterystykę kliniczną pacjentów przedstawiono w [Tab.1].

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna dzieci i młodzieży z T1DM

<https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/4685976/tab2/>

	Duration of diabetes			P value
	Duration of diabetes ≤ 2 years	Duration of diabetes $> 2; \leq 5$ years	Duration of diabetes > 5 years	
Age (years)	8 \pm 2.7	10.4 \pm 4.0	13.5 \pm 2.5	P = 0.053* P = 0.000** P = 0.003***
HbA1c%	6.9 \pm 0.6	7.8 \pm 1.3	8.1 \pm 1.3	P = 0.02* P = 0.01** P = 0.36
hsCRP mg/dl	2.7 \pm 2.3	2.0 \pm 1.9	3.0 \pm 2.8	P = 0.23 P = 0.74 P = 0.41
IL12 pg/ml	408 \pm 301	242 \pm 165	201.5 \pm 42.5	P = 0.04* P = 0.008** P = 0.70
Yeast-like fungi 10^3 - 10^6 CFU/g	21%	37%	42%	P = 0.54

Data are presented as means \pm SD. *Group with T1DM and duration of diabetes ≤ 2 years versus group $> 2; \leq 5$ years. **Group with T1DM and duration of diabetes ≤ 2 years versus group > 5 years. ***Group with T1DM and duration of diabetes $> 2; \leq 5$ years versus group > 5 years.

Następnie podjęto próbę wykrycia przeciwciał *C. albicans* w klasie IgG oraz IgM w surowicy krwi u dzieci i młodzieży z T1DM. W grupie pacjentów z czasem trwania cukrzycy ≤ 2 lat nie wykryto obecności przeciwciał *C. albicans* w klasie IgG. Natomiast u dzieci i młodzieży z czasem trwania cukrzycy >2 ; ≤ 5 lat wykryto wyższe lecz nie istotnie statystycznie stężenie przeciwciał *C. albicans* w klasie IgG w porównaniu do grupy pacjentów z czasem trwania cukrzycy >5 lat. Nie wykryto obecności przeciwciał *C. albicans* w klasie IgM w surowicy krwi pacjentów z T1DM jak też w zdrowej grupie kontrolnej [Tab.2].

Tabela 2. Obecność przeciwciał *C. albicans* w klasie IgG oraz IgM w surowicy krwi u dzieci i młodzieży z T1DM <https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/4685976/tab3/>

	Duration of diabetes			P value
	Duration of diabetes ≤ 2 years	Duration of diabetes $> 2; \leq 5$ years	Duration of diabetes > 5 years	
<i>Candida albicans</i> IgG (DU)	Not detected (—)	19.4 \pm 20.2 (+)	14.9 \pm 15.3 (+)	P = 0.45
<i>Candia albicans</i> IgM (DU)	Not detected (—)	Not detected (—)	Not detected (—)	—

Badanie serologiczne jest jednym z elementów diagnostyki zakażenia. W naszym badaniu wykryto wyższy aczkolwiek w granicach normy [wg. kryteriów EORTC/IFI] , poziom przeciwciał *C. albicans* IgG w surowicy krwi u pacjentów z T1DM w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej [72]. Dodatni wyższy poziom przeciwciał *C.albicans* w klasie IgG jest najprawdopodobniej wynikiem reakcji na kontakt komórek grzybów drożdżopodobnych ze składnikami surowicy pacjentów z T1DM. Ze względu na zwiększoną przepuszczalność ścian jelita u pacjentów z T1DM istnieje zwiększone przenikanie antygenów grzybów drożdżopodobnych do łożyska naczyniowego. Wykrycie przeciwciał przeciwko *C. albicans* w klasie IgG odzwierciedla przebyte zakażenie. Wynik pojedynczego oznaczenia przeciwciał, interpretowany bez wyników innych badań mikologicznych, diagnostyki obrazowej oraz oceny stanu klinicznego pacjenta nie umożliwia rozróżnienia pomiędzy kolonizacją, miejscowymi postaciami kandydozy a formą inwazyjną zakażenia [73]. Wzrost poziomu przeciwciał *C. albicans*, zwłaszcza w klasie IgM może świadczyć o rozwoju aktywnego zakażenia. W naszym 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. Dodatkowym potwierdzeniem naszych wyników jest to, że pacjenci z T1DM w czasie badań nie skarżyli się na dolegliwości ze strony układu pokarmowego. Ponadto, co najmniej 3 miesiące przed badaniem grupa dzieci i młodzieży z T1DM nie była leczona antybiotykami.

Kluczowym wynikiem naszych badań 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 poziom IL12 lecz wzrost odsetka kolonii grzybów drożdżopodobnych izolowanych z kału dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. W dalszych etapie badań poprzez zastosowanie analizy regresji liniowej wykazano, że z każdym rokiem czasu trwania cukrzycy ogólnoustrojowa produkcja IL12 spada o 18.1 pg/ml. Co więcej wraz ze wzrostem o 1% HbA1c spada poziom IL12 o 52.9 pg/ml [Tab.3,4].

Tabela 3. Wyniki analizy regresji liniowej z IL12 jako zmienną zależną :
<https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/4685976/tab9/>

Variable	β	SD	t-value	P(> t)
Intercept	350.2	47.6	7.3	0.000000001
Duration of diabetes	-18.1	8.3	-2.1	0.03
Multiple R-squared = 0.09				
Adjusted R-squared = 0.07				

Dependent variable - IL12, independent variable – duration of diabetes, $p < 0.05$

Tabela 4. Wyniki analizy regresji liniowej z IL12 jako zmienną zależną
<https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/4685976/tab10/>

Variable	β	SD	t-value	P(> t)
Intercept	669.1	154.7	4.3	0.00007
HbA1c	-52.9	19.8	-2.6	0.01
Multiple R-squared = 0.12				
Adjusted R-squared = 0.10				

Dependent variable - IL12 , independent variable - HbA1c, $p < 0.05$

Rola IL12 w przebiegu cukrzycy typu 1 nie jest do końca wyjaśniona [74-78]. Indukowanie reakcji immunologicznej przez IL12 wynika z jej zdolności do pobudzania odpowiedzi typu komórkowego i jednoczesnego hamowania odpowiedzi typu humoralnego. Proces ten prowadzi do zaburzenia fizjologicznej równowagi reakcji immunologicznej. Dwadzieścia lat temu w 1996 roku, Rothe i wsp. w badaniach na nieotyłych myszach cukrzycowych (NOD) wykryli, iż IL12 przyczynia się do rozwoju cukrzycy typu 1 [79]. W tym samym roku wykazano silne właściwości anty-angiogenne IL12 [80]. Nie ulega wątpliwości, że u pacjentów z T1DM dominuje środowisko cytokin typu Th1 oraz nadprodukcja IL12, które przyczyniają się do „wybuchu cukrzycy typu 1”. Jednakże w dalszym czasie trwania cukrzycy IL12 pełni rolę czynnika angiogennego, co wykazano w naszych wcześniejszych badaniach [76-78]. Obecnie sugerujemy, że IL12 może także zapobiegać rozplemowi grzybów drożdżopodobnych. W naszej opinii są to pierwsze dowody przemawiające za ochronną rolą IL12 przeciw infekcjom grzybów drożdżopodobnych przewodu pokarmowego dzieci i młodzieży z T1DM. Aktualnie dostępne badania eksperymentalne potwierdzają

nasze sugestie. Otóż w oparciu o badania na myszach zainfekowanych *C.albicans* wykryto, iż myszy z deficytem IL12p40 wykazywały wyraźnie wyższy stopień kolonizacji *C.albicans* niż myszy z wysokim stężeniem IL12 [70]. Co więcej myszy z deficytem IL12p40 były bardziej podatne na kandydozę układu pokarmowego niż na infekcje układowe [71,72]. Chociaż zwiększone stężenie IL12 może korelować z nasileniem zapalenia w przebiegu cukrzycy to we wczesnych stadiach choroby IL12 może hamować ekspresję zapalenia jako wynik ujemnego sprzężenia zwrotnego [81,82]. W badanej grupie dzieci i młodzieży z T1DM nie wykryto związku między poziomem hsCRP a surowiczym poziomem IL12. Ten brak związku między poziomem hsCRP i IL12 może być wyjaśniony faktem, że zapalenie i wynikająca z tego odpowiedź immunologiczna są najbardziej zauważalne w pierwszych miesiącach choroby jako wynik destrukcji komórek β trzustki [83]. W dotychczasowych badaniach również naszego zespołu wykazano, że w kolejnych latach trwania cukrzycy typu 1 u pacjentów rozwija się stan zapalny niskiego stopnia, poczym wraz z czasem trwania choroby > 5lat dochodzi przewlekłego stanu zapalnego [74,76-78,84]. Z drugiej strony, brak różnic w poziomach hsCRP i brak korelacji z poziomem IL12 w surowicy może sugerować "dobrą pamięć metaboliczną" oraz utrzymujący się stabilny stan zapalny [85]. W naszym badaniu stwierdzono, że grupa dzieci i młodzieży z najkrótszym czasem trwania cukrzycy do 2 lat była dobrze wyrównana metabolicznie z stężeniem HbA1c= 6.9 \pm 0.6%. Natomiast wraz z czasem trwania choroby wykryto wyższy HbA1c i najwyższy HbA1c= 8.1 \pm 1.3% wykryto u pacjentów z czasem trwania choroby powyżej 5 lat. Wreszcie, analiza wariancji dwuczynnikowej wykazała, że poziom IL12 w surowicy wraz z czasem trwania cukrzycy jest skorelowany z częstością występowania grzybów drożdżopodobnych u pacjentów z T1DM. Wyniki naszych badań wykazały, że 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. Sugerujemy, że 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 dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

W publikacji *“No effect of yeast-like fungi on lipid metabolism and vascular endothelial growth factor level in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus”* Zorena K, **Kowalewska B**, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. *Italian Journal of Pediatrics*, DOI: 10.1186/s13052-016-0317-9 badano wpływ grzybów drożdżopodobnych na profil lipidowy oraz stężenie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w surowicy krwi u dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

U pacjentów z T1DM jednym z ważniejszych celów leczenia jest zapobieganie rozwojowi przewlekłym powikłaniom naczyniowym. 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 [86,87]. Liczne badania wykazały, że ryzyko późnych powikłań cukrzycowych zwiększa się wówczas, gdy hiperglikemii towarzyszą zaburzenia gospodarki lipidowej oraz wysokie wartości ciśnienia tętniczego [88-91]. VEGF jest silnym czynnikiem mitotycznym i chemotaktycznym dla komórek śródbłonna, co stymuluje tworzenie nowych naczyń. Zwiększa przepuszczalność naczyń, ułatwia tworzenie obrzęku i przechodzenie komórek z krwiobiegu do miejsc toczącego się zapalenia. VEGF jest istotnym czynnikiem inicjującym powstanie odczynu zapalnego w chorobach przewlekłych [92,93]. Dane literaturowe dotyczące wpływu gospodarki lipidowej w T1DM nie są jednomyślne. Niektórzy autorzy prac nie wykazują powiązania zwiększonego poziomu lipidów a objawami retinopatii w T1DM [94]. Z kolei inni autorzy zwracają uwagę na powiązania nieprawidłowości profilu lipidowego oraz niewyrównania metabolicznego a ryzykiem rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych [95,96]. Ponadto wciąż nie do końca znana jest rola grzybów drożdżopodobnych w przebiegu cukrzycy [22,23,97]. W odpowiedzi na obecność obcych antygenów w organizmie człowieka uruchamiane są ściśle ze sobą powiązane, mechanizmy odpowiedzi immunologicznej nieswoistej oraz swoistej. Z jednej strony prowadzą do eliminacji czynnika wywołującego zaś z drugiej mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonowania organizmu a nawet śmierci [54,98,99]. Wciąż trwają badania zarówno naszego zespołu jak też innych w celu wyjaśnienia wirulencji grzybów drożdżopodobnych i jej skutków u pacjentów T1DM [54,97]. Jednakże, udowodnienie

związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy infekcjami a wystąpieniem objawów narządowych u pacjentów T1DM jest niezwykle trudne. Główny problem stanowi niejednokrotnie długi okres pomiędzy ekspozycją na antygen a wystąpieniem klinicznych objawów powikłań narządowych [98]. Dlatego też obecnie celem naszych badań była ocena ilości grzybów drożdżopodobnych zasiedlających przewód pokarmowy u dzieci i młodzieży z T1DM wolnych od powikłań zarówno mikro- jak też mikronaczyniowych w kontekście wybranych parametrów gospodarki lipidowej oraz surowiczego poziomu VEGF.

Badaniem objęto 45 dzieci z T1DM w wieku 9.2 +/- 3.6 lat z czasem trwania cukrzycy 5.0 +/- 3.0 leczonych w Przychodni Diabetologii Dziecięcej Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku oraz 27 zdrowych dzieci w wieku 9.8 +/- 4.5 lat odpowiednio dobranych pod względem wieku i płci. W celu określenia ilości grzybów drożdżopodobnych w 1 gramie kału zastosowano posiew ilościowy na podłożu Sabourauda (Sabouraud Dextrose Agar). Materiał badawczy stanowiły świeże próbki kału pobranego od dzieci z T1DM oraz zdrowej grupy kontrolnej. Ze względu na ilość grzybów wyhodowanych w 1 g/kału przyjęto następujące wartości wzrostu grzybów drożdżopodobnych od 0-10³CFU/1g oraz od 10³ -10⁶CFU/1g kału. W badanej grupie dzieci i młodzieży z T1DM z ilością grzybów drożdżopodobnych 10³ CFU/g wykazano niższy poziom HbA1c, niższy poziom cholesterolu całkowitego, niższy poziom cholesterolu frakcji LDL jak też niższe surowicze stężenie VEGF w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM u których obecność grzybów drożdżopodobnych zasiedlających przewód pokarmowy wykryto w ilości powyżej 10³ CFU/g -10⁶ CFU/g . Jednak różnice te nie były istotne statystycznie wyniki zestawione w tabeli 3 oryginalnego artykułu [Tab.5].

Tabela 5. Kliniczna charakterystyka pacjentów z T1DM w odniesieniu do ilości grzybów drożdżopodobnych w układzie pokarmowym

<https://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13052-016-0317-9>

Yeast-like fungi	HbA1c %	Total cholesterol (mg/dl)	LDL-cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	VEGF (pg/ml)
10 ³ CFU/g n = 19	7.1 ± 0.8	172.81 ± 29.33	101.87 ± 23.65	59.4 ± 8.3	32703 ± 179.9
10 ⁶ CFU/g n = 26	7.4 ± 1.9	183.52 ± 20.89	107.41 ± 18.89	51.6 ± 12.4	37037 ± 194.84
p-value	0.01*	0.14	0.23	0.41	0.32

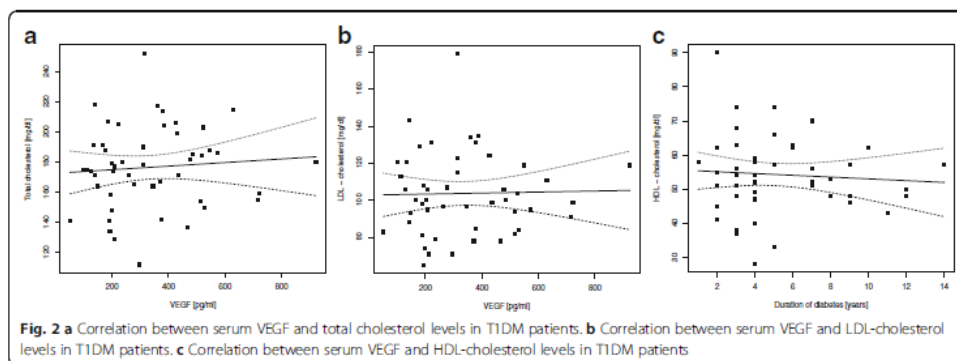
The results are presented as ± SD, significance (p < 0.05)

Abbreviations: VEGF vascular endothelial growth factor, LDL Low-density lipoprotein cholesterol, HDL High-density lipoprotein cholesterol

W kolejnym etapie badań poszukiwano związku pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF a profilem lipidowym u dzieci i młodzieży z T1DM. W badanej grupie dzieci i młodzieży z T1DM nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF a cholesterolem całkowitym $R_s = -0.105$, $p = 0.459$, pomiędzy VEGF a cholesterolem frakcji LDL $R_s = 0.005$, $p = 0.973$ jak też pomiędzy stężeniem VEGF w surowicy krwi a cholesterolem frakcji HDL [Ryc.6abc].

Rycina 6. Korelacja między surowiczym stężeniem VEGF a cholesterolem całkowitym(a), LDL (b), HDL (c)

<https://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13052-016-0317-9>



Brak związku pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF a gospodarką lipidową oraz poziomem HbA1c można z jednej strony wytłumaczyć coraz lepszymi metodami insulinoterapii pacjentów z T1DM, zaś z drugiej anty-zapalnym działaniem cholesterolu frakcji HDL. W badaniach in vivo wykazano, że cholesterol frakcji HDL wykazuje zdolność przeciwzapalną i hamuje rozwój miażdżycy. Autorzy pracy Cetinkalp i wsp. u pacjentów z T1DM leczonych za pomocą osobistych pomp insulinowych wykryli ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF, poziomem CRP a cholesterolem HDL [100]. Autorzy sugerują, że insulinoterapia za pomocą osobistych pomp insulinowych powoduje wzrost stężenia cholesterolu HDL, który ujemnie może wpływać zarówno na poziom białka C-reaktywnego jak też VEGF. Autorzy wskazują na prawdopodobieństwo w zapobieganiu progresji miażdżycy, a tym samym zmniejszenie ryzyka rozwoju choroby wieńcowej poprzez ciągły wlew insuliny przy pomocy osobistych pomp insulinowych u pacjentów z T1DM [100]. W naszej badanej grupie 75% pacjentów z T1DM stosowało insulinoterapię za pomocą osobistych pomp insulinowych zintegrowanych z systemem ciągłego monitorowania glikemii. Należy

podkreślić, że dzieci z T1DM coraz częściej uzyskują docelowe wartości poziomu HbA1c dzięki zastosowaniu w terapii osobistych pomp insulinowych zintegrowanych z systemem ciągłego monitorowania glikemii [101-103]. Co więcej grupa dzieci z T1DM oraz ich rodzice/prawni opiekunowie byli pod stałą opieką zespołu terapeutycznego w skład którego wchodził lekarz-diabetolog, pielęgniarka, dietetyk, psycholog, rehabilitant jak też edukator. Edukacja motywuje do podjęcia trudów związanych z insulinoterapią, przeciwdziała powstawaniu lęku, eliminuje stres oraz niepewność przed przyszłością [104]. Dlatego też prawidłowo przeprowadzona edukacja i reedukacja umożliwia prawidłowe wyrównanie metaboliczne cukrzycy jak też może zapobiegać lub opóźniać rozwój przewlekłych powikłań naczyniowych. *Reasumując*, w naszym badaniu nie wykazano związku pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF a gospodarką lipidową jak też nie wykazano wpływu ilości grzybów drożdżopodobnych na stężenie VEGF u pacjentów z T1DM. Kompleksowa opieka pacjenta z T1DM oraz intensyfikacja leczenia poprzez osobiste pompy insulinowe może zminimalizować lub wykluczyć rozwój przewlekłych powikłań cukrzycowych.

VI. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że:

- Grzyby drożdżopodobne izolowane z kału dzieci z T1DM były bardziej zróżnicowane gatunkowo w porównaniu do grzybów drożdżopodobnych izolowanych z kału dzieci grupy kontrolnej.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nie wykazano wpływu ilości grzybów drożdżopodobnych (10^3 - 10^6 CFU/g) na badane parametry profilu lipidowego, parametry wyrównania metabolicznego jak też VEGF w grupie dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

VII. Piśmiennictwo

1. Insel RA, Dunne JL, Atkinson, MA et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015; 38: 1964–1974.
2. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Nov 2(11). pii: a007641. doi: 10.1101/cshperspect.a007641.
3. Krętowski A. Współczesne poglądy na etiopatogenezę cukrzycy typu 1 *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2003; 3(5): 395–406.
4. Atkinson MA. Thirty Years of Investigating the Autoimmune Basis for Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2005 May;54(5): 1253-1263.
5. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G, the EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009; 373: 2027–2033.
6. Chobot A, Polanska J, Deja G, Jarosz-Chobot P. Incidence of type 1 diabetes among Polish children ages 0-14 years from 1989-2012. *Acta Diabetol*. 2015 ; 52(3):483-8.
7. Pociot F, Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016 4;387(10035):2331-9.
8. Antosik K, Borowiec M. Genetic Factors of Diabetes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016 Dec;64(Suppl 1):157-160. doi: 10.1007/s00005-016-0432-8.
9. McDonald TJ, Colclough K, Brown R. et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011 Sep;28(9):1028-33. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03287.x.
10. Knip M, Simell O. Environmental Triggers of Type 1 Diabetes *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jul; 2(7): a007690. doi:10.1101/cshperspect.a007690.
11. Nielsen DS, Krych Ł, Buschard K, Hansen CH, Hansen A.K. Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett*. 2014; 588(22):4234-43. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.010. Epub 2014 Apr 18.

12. Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005 ;54 Suppl 2:S125-36.
13. Antvorskov JC., Josefsen K, Engkilde K, Funda DP, Buschard K. Dietary gluten and the development of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014;Sep 57(9):1770-80. doi: 10.1007/s00125-014-3265-1.
14. van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*.2007; 23(3): 169-83.
15. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* . 2008; 93(6):512–517.
16. Serena G, Camhi S, Sturgeon C, Yan S, Fasano A. The Role of Gluten in Celiac Disease and Type 1 Diabetes. *Nutrients*. 2015 ; 7(9): 7143–7162. doi:10.3390/nu7095329.
17. Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J, ABIS-Study Group. Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes-related autoantibodies in 21/2 year-old Swedish children. *Br. J. Nutr*. 2006;95:603–608. doi: 10.1079/BJN20051676.
18. Lamb MM, Miller M, Seifert JA, et al. The Effect of Childhood Cow's Milk Intake and HLA-DR Genotype on Risk of Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Pediatr Diabetes*. 2015; 16(1): 31–38. doi:10.1111/pedi.12115.
19. Hummel S, Pflüger M, Hummel M, Bonifacio E, Ziegler AG. Primary Dietary Intervention Study to Reduce the Risk of Islet Autoimmunity in Children at Increased Risk for Type 1 Diabetes The BABYDIET study. *Diabetes Care*. 2011 Jun; 34(6): 1301–1305. doi:10.2337/dc10-2456.
20. Wadsworth EJK, Shield JPH, Hunt LP, Baum JD. A case-control study of environmental factors associated with diabetes in the under 5s. *Diabet Med*. 1997; 14: 390–396.
21. Boerner BP., Sarvetnick NE. Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1243 (2011); 103–118 doi: 10.1111/j.1749-.2011.06340.x.
22. Vaarala O. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *Rev Diabet Stud* 2012; 9:251-259.

23. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Medicine* 2013; 11:46 doi:10.1186/1741-7015-11-46.
24. Hu C, Wong FS, Wen L. Type 1 diabetes and gut microbiota: friend or foe? *Pharmacol Res.* 2015; 98: 9–15. doi:10.1016/j.phrs.2015.02.006.
25. Gülden E, Wong S, Wen L. The Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol.* 2015; 159(2): 143–153. doi:10.1016/j.clim.2015.05.013.
26. Underhill DM, Iliev LD. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(6): 405–416. doi:10.1038/nri3684.
27. Bibbò S, Dore MP, Pes GM, Delitala G, Delitala AP. Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis? *Ann Med.* 2016; 8:1-25. [Epub ahead of print]
28. Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A et al. Triplett E.W. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PloS one.* 2011; 6:e25792.
29. Giongo A, Gano KA, Crabb DB et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME journal.* 2011; 5:82–91. [PubMed: 20613793]
30. Erb Downward JR, Falkowski NR, Mason KL, Muraglia R, Huffnagle GB. Modulation of post-antibiotic bacterial community reassembly and host response by *Candida albicans*. *Sci Rep.* 2013; 3:2191 doi: 10.1038/srep02191.
31. Richardson MD, Warnock DW. Grzybnice. Rozpoznanie i leczenie. *Springer PWN* 1995.
32. Odds FC. *Candida and Candidiasis: A review and bibliography.* London, Balliere Tindall, 1988.
33. Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7: 336–41.
34. Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106 (51-52): 837-42. doi: 10.3238/arztebl.2009.0837.
35. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2008; 6: 67–78.

36. Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J, Siennicka K, Magda U, Kurzątkowski W. Czynniki zjadliwości *Candida albicans*. *Przegl. Epidemiol.* 2012; 66: 629-633.
37. Walker LA, MacCallum DM, Bertram G, Gow NA, Odds FC, Brown AJ. Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal Genet Biol.* 2009; 46: 210–9.
38. Rizzetto L, De Filippo C, Cavalieri D. Mycobiota: Micro-Eukaryotes Inhabiting Our Body as Commensals or Opportunistic Pathogens. *Fungal Genom Biol.* 2015;5, 120. doi:10.4172/2165-8056.1000120.
39. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6: 338–43.
40. Karkowska-Kuleta J. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. *Acta Bioch.Pol.* 2009; 56, 2: 211-224.
41. Brown AJ, Odds FC, Gow NA. Infection related gene expression in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10, 307-313.
42. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 327-335.
43. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta tropica* 2002;81: 101-110.
44. Dühning S, Germerodt S, Skerka C, Zipfel PF, Dandekar T, Schuster S. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans*- understanding and modeling defense and evasion strategies. *Front. Microbiol.* 2015; 6:625. doi: 10.3389/fmicb.2015.00625.
45. Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection *Current Opinion in Microbiology* 2012; 15:1–7.
46. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect. Immun.* 2012; 80,1304–1313. doi:10.1128/IAI.06146-11.
47. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2003; 36: 223-228
48. Sochocka M. Rozpoznawanie patogenów przez wrodzony system odporności (Recognition of pathogens by innate immunity) *Postępy Hig Med Dosw.* 2008; 62: 676-687.

49. Kurnatowski P , Kurnatowska AJ. Odpowiedź immunologiczna na zarażenie grzybami. The immune response to fungal infections. *Wiadomości Parazytologiczne* 2010; 56(1), 23–27.
50. Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev.* 1995 Dec; 59(4): 646-672
51. Aybay C, Imir T. Tumor necrosis factor (TNF) induction from monocyte/macrophages by *Candida* species. *Immunobiology.* 1996; 196(4): 363-374.
52. Hajishengallis G, Lambris JD. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 ; 11(3): 187-200.
53. Drozdowska A, Drzewoski J. Mycoses in diabetes - difficult diagnostic and therapeutic problem. Review of literature. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2008; 8, 1: 1-11.
54. Gosiewski T, Salamon D, Szopa M, Sroka A, Malecki MT, Bulanda M. Quantitative evaluation of fungi of the genus *Candida* in the feces of adult patients with type 1 and 2 diabetes - a pilot study. *Gut Pathog.* 2014; 15;6(1):43. doi: 10.1186/s13099-014-0043-z. eCollection 2014.
55. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AO, et al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida spp.* oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(6): 549-55. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.11.018. Epub 2010 Dec 22.
56. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26: 259–265.
57. Kumar BV, Padshetty NS, Bai KY, Rao MS. Prevalence of *Candida* in the Oral Cavity of Diabetic Subjects *JAPI* , 2005; 53: 599-602.
58. Tapper-Jones LM, Aldred MJ, Walker DM. Hayes T.M. Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouths of diabetics *J.Clin. Pathol* 1981; 34: 706-711.
59. Bartholomew GA, Rodu B, Bell D. Oral candidiasis in patients with diabetes mellitus: a thorough analysis. *Diabetes Care* 1987; 10.(5) : 607-612.
60. Kurnatowski M, Wąsowska-Królikowska K, Kurnatowska A. Analiza prevalencji grzybów i ich gatunków w przewodzie pokarmowym osób dorosłych i dzieci. *Wiad. Parazytol.* 2002; 48,4: 435-439.

61. Cisko M, Wąsik-Kuprianowicz A, Baran E, Noczyńska A. Występowanie grzybów drożdżopodobnych i grzybów pleśniowych w przewodzie pokarmowym dzieci chorych na cukrzycę typu 1. Część II Jakościowa i ilościowa ocena grzybów w kale. *Mikol. lek.* 2003; 10(3): 193-198.
62. Nowakowska M, Jarosz-Chobot P. Flora bakteryjna i grzybicza w wybranych materiałach klinicznych u dzieci z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2002; 8(2): 83-88.
63. Pawlik B, Macura A, Bialek-Kaleta J. Występowanie grzybów w kale u dzieci. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2002; 54: 273-279.
64. Kurnatowski M, Wąsowska-Królikowska K, Kurnatowska A. Badania mikologiczne próbek kału dzieci z objawami czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i żywienie Dziecka.* 2003; 5(4): 233-235.
65. Blazhev A, Nicoloff G, Petrova Ch, Jordanova-Laleva P. Serum Levels Of Interleukin 12 And Interleukin 18 In Diabetic Children. *Diabetol Croat* 2006; 35:1-4.
66. Alghobashy AA, Shokry D, Gawish HH. Interleukin-12 levels in Egyptian children with type 1 diabetes mellitus. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol* 2013;11(1):41-45
67. Wegner M, Pioruńska-Stolzmann M. Znaczenie IL-12 w rozwoju i przebiegu cukrzycy typu 1. The impact of IL-12 on the process of development and occurrence of diabetes type 1. *Diabetologia Praktyczna* 2008; 9, 3-4: 176-181.
68. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(5): 361-8.
69. Farah CS, Hu Y, Riminton S, Ashman RB. Distinct roles for interleukin-12p40 and tumor necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting. *Oral Microbiology and Immunology* 2006; 21:4, 252-255.
70. Mencacci A, Cenci E, Del Sero G et al. IL-10 Is Required for Development of Protective Th1 Responses in IL-12-Deficient Mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998; 161(11):6228-6237.

71. Netea MG, Vonk AG, van den Hoven M, et al. Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol.* 2003; 33(12):3409-17.
72. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group, *Clinical Infectious Diseases*, 2008; 46: 1813–1821.
73. Year H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001; 20, 12: 864–870.
74. Snell-Bergeon JK, West NA, Mayer-Davis EJ , et al., Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH case-control study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2010; 95 (6): 2868–2876
75. Adorini L. Interleukin 12 and autoimmune diabetes. *Nat. Genet.* 2001; 27: 131–132.
76. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczyńska K. Interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha equilibrium is a prerequisite for clinical course free from late complications in children with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 2008;67:204-8.
77. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczyńska K. Interleukin-12, vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor-alpha in the process of neoangiogenesis of diabetic retinopathy in children. *Klin Oczna.* 2007;109(4-6):155-9.
78. Zorena K, Kula M, Malinowska E, Raczyńska D, Myśliwiec M, Raczyńska K. Threshold serum concentrations of tumour necrosis factor alpha (TNF α) as a potential marker of the presence of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Hum Immunol.* 2013 ;74(1):75-81. doi: 10.1016/j.humimm.2012.10.002.
79. Rothe H, Burkart V, Faust A, Kolb H. Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 1996; 39(1): 119-22.

80. Angiolillo AL, Sgadari C, Tosato G. A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;31:158-67.
81. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.* 1998;160: 5936–5944.
82. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1998;187: 537–546.
83. Özer G, Teker Z, Çetiner S. et al. Serum IL-1, IL-2, TNF α and INF γ levels of patients with type 1 diabetes mellitus and their siblings. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 2003;16 (2): 203–210.
84. Nocoń-Bohusz J, Noczyńska A. Evaluation the concentration of selected markers of the atherosclerosis process in children with diabetes type 1. *Endokrynologia Pediatria.* 2016; 15 (1): 17–27.
85. Cariello A, Ihnat M, Ross K. Evidence for a cellular ‘memory’ of hyperglycemic stress. *Diabetes.* 2005; 54, article 218A.
86. Virk SA, Donaghue KC, Cho YH, et al. Association Between HbA_{1c} Variability and Risk of Microvascular Complications in Adolescents with Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 May 17;jc20153604. [Epub ahead of print]
87. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycoxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(10): 913-9.
88. Klein BE, Klein R, McBride PE, et al. Cardiovascular disease, mortality, and retinal microvascular characteristics in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Intern Med.* 2004; 164(17): 1917-24.
89. Myśliwiec M, Zorena K, Balcerska A. The contribution of the selected parameters of lipid metabolism to the development of diabetic nephropathy in children and adolescents with diabetes mellitus type 1. *Diabetologia Praktyczna.* 2008;9:241-245.

90. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M et al. Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2010;24(11):755-62.
91. Głowińska-Olszewska B, Urban M, Urban B, Tołwińska J. Correlation Analysis Between Diabetic Retinopathy and Early Atherosclerotic Changes in Adolescents With Type 1 Diabetes - Preliminary Report. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2006;12 (2): 96-102.
92. Ferrara N. History of Discovery: Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29 (6): 789-91.
93. Agudo J, Ayuso E, Jimenez V. et al. Vascular endothelial growth factor-mediated islet hypervascularization and inflammation contribute to progressive reduction of β -cell mass. *Diabetes*. 2012;61(11): 2851-61.
94. Klein R, Myers CE, Lee KE et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein and the Incidence of Proliferative Diabetic Retinopathy and Clinically Significant Macular Edema Determined From Fundus Photographs. *JAMA Ophthalmol*. 2015 ;133(9):1054-61. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.2239.
95. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes. The SEARCH for Diabetes in Youth Case Control Study. *Diabetes Care* 2009;32:416-420.
96. Jankowska A, Horodnicka-Józwa A, Walczak M, Petriczko E, Syrenicz A, Mojsiewicz M. The Assessment of Selected Lipid Parameters in Children and Adolescents Suffering from Diabetes Mellitus Type 1. *Endokrynologia Pediatryczna* 2007;1(18):33-39.
97. Arendrup MC. Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J*. 2013 Nov; 60(11): B4698
98. Wirth R, Bauer J, Sieber C. Necrotizing Candida infection after percutaneous endoscopic gastrostomy: a fatal and rare complication. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008 May-Jun;32(3):285-7. doi: 10.1177/0148607108316190.
99. Hirai Y, Asahata S, Ainoda Y, Fujita T, Miura H, Hizuka N, Kikuchi K. Candidemia Diagnosed from Peripheral Blood Smear: Case Report and Review of Literature 1954-2013. *Mycopathologia*. 2015 ;180(1-2):111-6.
100. Cetinkalp S, Felekoglu C, Karadeniz M, Boyacioglu H, Delen Y, Yildirim E, Yilmaz C. Comparison of the effects of intensive insulin treatment modalities on

cardiovascular biomarkers in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr.* 2015 ;9(3):157-62

101. Rewers MJ, Pillay K, de Beaufort C, Craig ME, Hanas R, Acerini CL, Maahs DM. International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2014 ;15 Suppl 20:102-14. doi: 10.1111/pedi.12190
102. Tumminia A, Sciacca L, Frittitta L, Squatrito S, Vigneri R, Le Moli R, Tomaselli L. Integrated insulin pump therapy with continuous glucose monitoring for improved adherence: technology update. *Patient Prefer Adherence.* 2015; 7 (9):1263-70. doi: 10.2147/PPA.S69482.
103. Pickup JC, Freeman SC, Sutton AJ. Glycaemic control in type 1 diabetes during real time continuous glucose monitoring compared with self monitoring of blood glucose: meta - analysis of randomised controlled trials using individual patient data. *BMJ* 2011;343:3805.
104. van Dijk JW, Eijsvogels TM, Nyakayiru J, Schreuder TH, Hopman MT, Thijssen DH, van Loon LJ. Glycemic control during consecutive days with prolonged walking exercise in individuals with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016 ;117:74-81.

VIII. Streszczenie

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 nieliczne wyniki badań są rozbieżne. Dlatego też celem naszych badań była ocena jakościowa i ilościowa grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 w odniesieniu do wybranych parametrów immunologicznych. Cel główny realizowano poprzez cele szczegółowe:

- Charakterystyka szczepów grzybów z rodzaju *Candida* zasiedlających przewód pokarmowy dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 pod względem wybranych cech fenotypowych z uwzględnieniem lekooporności.
- Analiza surowiczego stężenia interleukiny 12 (IL12) w kontekście wyrównana metabolicznego oraz obecności grzybów drożdżopodobnych w układzie pokarmowym dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.
- Ocena poziomu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w odniesieniu do gospodarki lipidowej oraz ilości grzybów drożdżopodobnych zasiedlających przewód pokarmowy dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1.

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. Cukrzycę typu 1 rozpoznawano na podstawie wytycznych Polskiego

Towarzystwa Diabetologicznego, które jest zgodne z zaleceniami WHO. Wszyscy pacjenci byli w trakcie intensywnego leczenia insulinią (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). Materiał do badań w kierunku obecności grzybów drożdżopodobnych stanowił kał, który pobierano do jałowych pojemników i dostarczano do laboratorium przez rodziców badanych dzieci lub prawnych opiekunów w dniu pobrania. Z dostarczonego materiału w tym samym dniu zakładano hodowle w kierunku obecności grzybów drożdżopodobnych. Dzieci i młodzież z T1DM oraz badana grupa kontrolna w dniu dostarczenia próbek kału były badane przez lekarza pediatrę/diabetologa, który przeprowadził badanie fizykalne oraz podmiotowe. Ponadto od wszystkich badanych dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 oraz zdrowej grupy kontrolnej pobrano 2 ml krwi, poddano wirowaniu a uzyskane surowice zamrożono i przechowywano do dalszej analizy w temperaturze -80°C . U wszystkich badanych przeprowadzono pomiar poziomu IL12 oraz VEGF w surowicy przy użyciu testu komercyjnych testów ELISA. Ponadto wykonano badania immunoenzymatyczne przeciwciał *C. albicans* w klasie *IgG* oraz *IgM* w surowicy krwi dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1 oraz w zdrowej grupie kontrolnej również wykonano przy użyciu komercyjnych testów ELISA.

W pierwszym etapie badań określano 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 dodatnich 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.

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. Liczne badania wykazały, że ryzyko późnych powikłań cukrzycowych zwiększa się wówczas, gdy hiperglikemii towarzyszą zaburzenia gospodarki lipidowej oraz wysokie wartości ciśnienia tętniczego. VEGF jest silnym czynnikiem mitotycznym i chemotaktycznym dla komórek śródbłonna, co stymuluje tworzenie nowych naczyń. Zwiększa przepuszczalność naczyń, ułatwia tworzenie obrzęku i przechodzenie komórek z krwiobiegu do miejsc toczącego się zapalenia. 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. Dlatego też podjęto 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. Dlatego też kolejnym etapem naszych badań 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 naszej 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. Dodatni wyższy poziom przeciwciał *C.albicans* w klasie IgG jest najprawdopodobniej wynikiem reakcji na kontakt komórek grzybów drożdżopodobnych ze składnikami surowicy pacjentów z T1DM. Ze względu na zwiększoną przepuszczalność ścian jelita u pacjentów z T1DM istnieje zwiększone przenikanie antygenów grzybów drożdżopodobnych do łożyska naczyniowego. Wykrycie przeciwciał przeciwko *C. albicans* w klasie IgG odzwierciedla przebyte zakażenie. Wynik pojedynczego oznaczenia przeciwciał,

interpretowany bez wyników innych badań mikologicznych, diagnostyki obrazowej oraz oceny stanu klinicznego pacjenta nie umożliwi rozróżnienia pomiędzy kolonizacją, miejscowymi postaciami kandydozy a formą inwazyjną zakażenia. Wzrost poziomu przeciwciał *C. albicans*, zwłaszcza w klasie IgM może świadczyć o rozwoju aktywnego zakażenia. W naszym 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. Dodatkowym potwierdzeniem naszych wyników jest to, że pacjenci z T1DM w czasie badań nie skarżyli się na dolegliwości ze strony układu pokarmowego. Ponadto, co najmniej 3 miesiące przed badaniem grupa dzieci i młodzieży z T1DM nie była leczona antybiotykami. Kluczowym wynikiem naszych badań 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 [Tab.2]. W dalszym czasie trwania choroby u pacjentów z czasem trwania choroby > 2 lat<5 lat oraz u pacjentów > 5 lat trwania cukrzycy wykryto spadek poziom IL12 lecz wzrost odsetka kolonii grzybów drożdżopodobnych izolowanych z kału dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. Poprzez zastosowanie analizy regresji liniowej wykazano, że z każdym rokiem czasu trwania cukrzycy spada o 18.1 pg/ml ogólnoustrojowa produkcja IL12. Co więcej wraz ze wzrostem o 1% HbA1c spada poziom IL12 o 52.9 pg/ml. Ponadto w naszym badaniu stwierdzono, że grupa dzieci i młodzieży z najkrótszym czasem trwania cukrzycy do 2 lat była dobrze wyrównana metabolicznie z stężeniem HbA1c= 6.9 ±0.6%. Natomiast wraz z czasem trwania choroby wykryto wyższy % HbA1c i najwyższy HbA1c= 8.1±1.3% wykryto u pacjentów z czasem trwania choroby powyżej 5 lat. Wreszcie, analiza wariancji dwuczynnikowej wykazała, że poziom IL12 w surowicy wraz z czasem trwania cukrzycy jest skorelowany z częstością występowania grzybów drożdżopodobnych u pacjentów z T1DM. Sugerujemy, że 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 dzieci i młodzieży chorujących na cukrzycę typu 1. *W podsumowaniu:* Wyniki naszych badań wykazały, że grzyby drożdżopodobne izolowane z kału dzieci z T1DM były bardziej zróżnicowane gatunkowo w porównaniu

do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowano więcej szczepów *C.albicans*, które wykazywały słabszą wrażliwość na badane leki oraz okazały się mieć wyższą aktywność enzymatyczną. W grupie dzieci i młodzieży z T1DM bez powikłań zarówno miko- jak też makronacyniowych 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. Co więcej 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. Obecnie sugerujemy, że IL12 może także zapobiegać rozplemowi grzybów drożdżopodobnych. **W naszej opinii są to pierwsze dowody przemawiające za ochronną rolą IL12 przeciw infekcjom grzybów drożdżopodobnych przewodu pokarmowego dzieci i młodzieży z T1DM.**

IX. Abstract

In recent years, the frequency of fungal infections in human populations has increased considerably. The most common type of fungus attacking the human body is *Candida albicans*. The studies so far have shown that patients with type 1 diabetes (T1DM) are exposed, to a large degree, to complications related to fungal infections. A substantial growth of fungi observed in diabetic patients may unfavorably affect metabolic compensation, leading to increased demand for insulin as well as to the difficult to cure symptomatic infections. The increased risk of severe candidiasis-related problems is associated with increasing number of risk factors in patients, such as impaired immunity or the use of antibiotics, and the higher pathogenic potential of the isolated strain. Numerous reports have been published on the fungal colonization of oral cavity in diabetic patients, while studies investigating the occurrence of fungi in the gastrointestinal tract of such patients are scarce and the few results are divergent. Therefore, the aim of this research was to conduct qualitative and quantitative assessment of yeast-like fungi found in the feces of children and adolescents with T1DM with respect to selected immunological parameters. The main objective was achieved through the following specific objectives:

- Description of the yeast-like fungi of the genus *Candida* in the gastrointestinal tract of children and adolescents with T1DM in terms of selected phenotypic characteristics, including drug resistance.
- Application of an assay to investigate serum levels of interleukin-12 (IL12) in relation to metabolic control and the percentage of yeast-like fungi colonies residing in the gastrointestinal tract of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus.
- Assessment of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in the context of lipid metabolism and the amount of yeast-like fungi colonizing the digestive tract of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus.

The study involved 53 adolescent patients (19 girls and 34 boys aged 10.9 ± 3.9 yrs) with T1DM treated at the Clinics of Paediatrics, Diabetology and Endocrinology, Medical University of Gdańsk. Type 1 diabetes was diagnosed according to the guidelines of Polish Diabetes Association, which correspond to the WHO guidelines. All patients were under intensive insulin therapy (0.9 ± 0.2 IU of insulin per day/kg of body weight).

The control group consisted of 30 healthy children and adolescents (16 girls and 14 boys aged 10.3 ± 4.9 yrs). The sampled material consisted of fresh feces collected from the study participants. Fecal samples were collected in sterile containers and delivered to the laboratory on the same day. Upon arrival to the laboratory, the samples were used to establish cultures. Patients with T1DM and their matched controls were examined by a pediatrician on the day of fecal sample collection. A patient's medical history was recorded and the physical examination was performed for each subject. In addition, 2 ml of blood was drawn from each study participant (including the control group) and later centrifuged. The resulting serum samples were frozen and kept at -80°C until further analysis. The absorbance of IL12 and VEGF were measured with a commercially available ELISA test. Also, IgG and IgM antibodies against *C. albicans* were measured in serum collected from children and adolescents with T1DM and the control group by means of commercially available ELISA test. In the first stage of the study, the frequency and number of fungal yeast-like colonies in feces, species diversity, drug susceptibility and enzyme activity were determined. In our study, the yeast-like fungal growth in fecal samples was detected in 40 (75.4%) patients with T1DM and 21 (70%) control subjects. The conducted research demonstrated that children and adolescents with T1DM have higher species diversity of yeast-like fungi. In total, 47 strains of yeast-like fungi grew in the fungus-positive fecal samples of children with T1DM; the isolated strains belonged to nine species. In the material collected from the control group, 21 yeast-like fungal strains were detected that belonged to four species. In the case of children with T1DM, there was a larger number of *C. albicans* strains with lower susceptibility to the tested drugs (72% in children with T1DM and only 41% in the control group) and higher enzyme activity compared to the strains isolated from the control samples.

In patients with T1DM, one of the most important purposes of treatment is to prevent the development of long-term vascular complications. Once T1DM is diagnosed, it is critical to control the level of HbA1c, lipid parameters, blood pressure and other risk factors of long-term vascular complications. Based on currently available data, the metabolic control of diabetes mellitus is one of the most important factors affecting the risk of long-term angiopathic complications. There is a lot of evidence that the risk of long-term diabetic complications increases in cases when hyperglycaemia is accompanied by lipid metabolism disorders and high blood pressure.

VEGF acts as a potent mitogenic and chemotactic factor for endothelial cells, thereby stimulating angiogenesis. VEGF can increase vascular permeability. It favors pulmonary edema formation, and enhances the migration of cells from the circulating blood into the sites of inflammation. VEGF is an important factor that triggers inflammatory processes in chronic diseases.

The literature data on the role of lipid management in T1DM are not consistent. Moreover, the influence of yeast-like fungi on the course of the disease is not completely known. Therefore, the aim of our current study was to investigate VEGF levels in the context of selected lipid metabolism parameters and the amount of yeast-like fungi colonizing the alimentary tract of children and adolescents with T1DM. In the group of children and adolescents with T1DM who were free of micro- or macrovascular complications, no correlation between the serum VEGF levels and lipid profile was found. Moreover, no relationship between the amount of yeast-like fungi and selected lipid parameters or VEGF levels was observed in patients with T1DM.

The role of IL12 in the defense mechanisms protecting against *Candida albicans* infections has been presented in an experimental murine model. No data are available on the IL12 status in the context of yeast-like fungal infections in children and adolescents with T1DM. Therefore, the objective of our research was to investigate the relationship between the serum levels of IL12 and yeast-like fungal colonies in the digestive tract, metabolic control and the duration of diabetes in children and adolescents with T1DM. In our study, we observed the elevated level of IgG antibodies against *Candida albicans* in serum of patients with T1DM compared to the control group, although all values remained within the normal range. The observed higher level of IgG antibodies against *Candida albicans* most likely resulted from the contact of yeast-like fungi cells with the elements of serum of patients with T1DM. Due to increased intestinal permeability in patients with T1DM, there is a higher risk of transferring the fungal antigen to the vascular bed. The detection of IgG antibodies against *Candida albicans* indicates a past infection. The result of a single antibody test, interpreted without other mycological tests, imaging diagnostics, and evaluation of the patient's clinical condition, does not allow for distinguishing between colonization, local forms of candidiasis, and the invasive form of infection. Increased levels of *Candida albicans* antibodies, particularly of IgM class, may indicate the development of active infection. In our group of patients with T1DM, the serum level of IgM antibodies against *Candida albicans* was negative, which indicates the lack of ongoing

gastrointestinal infection. Moreover, children and adolescents with T1DM did not report any gastrointestinal complaints during the study duration. They had not been receiving antibiotics for up to 3 months prior to participation in the study. The key finding of our research is that children and adolescents at early stages of diabetes (up to 2 yrs duration) had lower percentage of yeast-like fungal colonies and higher level of IL12 compared to patients with the diabetes duration > 2 yrs, >5 yrs and ≤5 yrs. The analysis for double classification showed that the duration of diabetes and fungal colonies in the amount of 10^3 – 10^6 CFU/g significantly affect IL12 level. Moreover, the linear regression analysis demonstrated that the serum levels of IL12 decreased by 18.1 pg/ml with each year of diabetes duration. In the studied group, the serum levels of IL12 also decreased by 52.9 pg/ml with each 1% increase in HbA1c levels. In our study, the subgroup of children and adolescents with the shortest duration of diabetes (up to 2 yrs) showed good metabolic control, with HbA1c levels of $6.9 \pm 0.6\%$. The mean HbA1c level increased with increasing duration of diabetes, reaching the highest value of 8.1 ± 1.3 in patients with diabetes duration of more than 5 years. Finally, the analysis of variance showed that the serum level of IL12 and duration of diabetes are correlated with the prevalence of yeast-like fungi in patients with T1DM. We propose that IL12 overproduction during the early years of diabetes probably not only helps maintain the status-quo with no angiopathic complications, but also can protect against infections with yeast-like fungi colonizing the digestive tract of children with T1DM. In conclusion, the yeast-like fungi isolated from fecal samples of children with T1DM showed more species diversity than those isolated from the control samples. Also, more *C. albicans* strains in T1DM group showed lower susceptibility to the tested drugs and higher enzyme activity. In the group of children and adolescents with T1DM who were free of micro- or macrovascular complications, no correlation between the serum levels of VEGF and lipid profile was found. Moreover, no relationship between the amount of yeast-like fungi and selected lipid parameters or VEGF levels was observed in patients with T1DM. The results of our research show that high IL12 levels and good metabolic control maintain the prevalence of yeast-like fungi in the digestive tract within the normal range in patients with type 1 diabetes of up to 5-yr duration. We propose that high IL12 levels may prevent the presence of yeast-like fungi in the digestive tract. **To the best of our knowledge, this is the first proof of the protective role of IL12 against yeast-like fungal infections of the gastrointestinal tract in children and adolescents with T1DM.**