

Gdańsk, 08.11.2019 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Beaty Małachowskiej

pt. „Profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań cukrzycy typu 1 u dzieci”

wykonanej w Zakładzie Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej w I Katedrze Pediatrii

pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Wojciecha Fendlera, prof. UM w Łodzi

### Formalna charakterystyka pracy

Przedłożona do oceny praca doktorska Pani lek. med. Beaty Małachowskiej stanowi spójny opis wykonanych przez Doktorantkę eksperymentów. Składa się z typowych dla tego typu dzieł części tj. wstępu, opisu założeń i celów pracy, metodyki, opisu rezultatów, dyskusji, wniosków, spisu tabel i rycin, streszczenia w języku polskim i angielskim. Bibliografia obejmuje 123 pozycje.

Jak podano na początku rozprawy, badania przedstawione w pracy doktorskiej lek. med. Beaty Małachowskiej otrzymały wsparcie z trzech źródeł (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, środki statutowe dla Młodych Naukowców UM w Łodzi, stypendium naukowe Fundacji Polfarmy). Nie ma informacji na temat tego, czy wyniki będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały opublikowane lub też złożone do publikacji. Nie ma też informacji na temat dotychczasowego dorobku Doktorantki.

Na podstawie przedstawionej do recenzji rozprawy można stwierdzić, że Pani Beata Małachowska podczas wykonywania swojej pracy doktorskiej brała udział w doborze pacjentów cukrzycowych do badań, zebraniu danych klinicznych, zebraniu próbek i zabezpieczeniu materiału biologicznego, przygotowaniu próbek surowicy do oznaczeń metabolomicznych, pomiaru poziomu metabolitów, identyfikacji metabolitów oraz analizie danych.

### Merytoryczna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska lek. med. Beaty Małachowskiej dotyczy wybranych zagadnień profilowania metabolomicznego ostrych powikłań cukrzycy typu 1 u dzieci. Doktorantka szczególną uwagę poświęca kwasicy ketonowej i hipoglikemii. Jest to temat istotny z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej, jako że cukrzyca typu 1 jest najczęstszą przewlekłą

chorobą występującą u dzieci, natomiast kwasica ketonowa i hipoglikemia są jednymi z poważniejszych ostrych powikłań będących wynikiem choroby, o szczególnym znaczeniu społecznym ze względu na zagrożenie życia oraz wysokie koszty leczenia. Z danych epidemiologicznych wynika, że kwasica ketonowa i hipoglikemia są najczęstszymi przyczynami zgonów u dzieci z cukrzycą typu 1. Szacuje się, że około 30% dzieci w wieku przedszkolnym trafia do szpitala w wyniku w/w powikłań, co może świadczyć o zbyt późnym rozpoznawaniu samej cukrzycy, jak i jej powikłań na poziomie lekarza pierwszego kontaktu. Co więcej, w następstwie ostrych powikłań cukrzycowych najczęściej dochodzi do licznymi nieodwracalnych ogólnosystemowych konsekwencji (tzw. piętno metaboliczne), które mogą przyczyniać się do uszkodzenia organizmu w dłuższym okresie. Dlatego też ważne jest opracowanie metod pozwalających określić profil metaboliczny pacjentów po takich epizodach, aby móc prawidłowo zdiagnozować przebieg ostrego powikłania cukrzycowego, i jest to zagadnienie podjęte przez Doktorantkę.

We wstępie Doktorantka zwięźle opisuje zasadność podjętej tematyki, przedstawiając zarówno przyczyny jak i konsekwencje kwasicy ketonowej oraz hipoglikemii. Po zapoznaniu się ze wstępem czytelnik ma prawidłowy ogłąd na to, że konsekwencje kwasicy ketonowej oraz hipoglikemii są ogromne, i wpływają na funkcjonowanie całego organizmu, czyli układu krwionośnego, oddechowego, nerwowego. Jednocześnie informacje te mogłyby być bardziej uporządkowane a podrozdziały inaczej zredagowane. Pomocne byłyby też tabele systematyzujące i zbierające zarówno przyczyny obu powikłań oraz konsekwencje, które mogą się rozwinąć w wyniku tych powikłań w obrębie poszczególnych układów. W obecnej formie pracy trochę wymieszane są dane dotyczące zarówno opisu cukrzycy typu 1 i 2 (praca nie dotyczy cukrzycy typu 2 więc zaburza to trochę obraz), jak i konsekwencji wystąpienia tych zaburzeń u dzieci oraz dorosłych, nie ma też wyraźnego odniesienia jak problem wygląda w populacji dzieci chorych na cukrzycę w Polsce. Wiele danych jest nieuporządkowanych i dotyczą różnych części świata, a wiadomo, że rozkład zachorowalności na cukrzycę nie jest równomierny i Polska jest krajem o najwyższym współczynniku zachorowalności. Brak też jest jakiegokolwiek wzmianki na temat ewentualnej diety i jej wpływu na występowanie powikłań cukrzycowych, ich przebieg oraz odległe konsekwencje i piętno metaboliczne.

Cel pracy jest zawarty w czterech zwięzłych punktach (na stronie 18 rozprawy).

Materiały i metod są dobrze opisane i nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do grup badawczych, zastosowanych analiz, wykorzystanych odczynników oraz sprzętu. Można mieć uwagi co do rozpiętości wiekowej osób badanych (2-19 lat). Przebieg kwasicy ketonowej oraz hipoglikemii, a także konsekwencje obu tych procesów różnią się znacznie pomiędzy małymi dziećmi a osobami dorosłymi. W przypadku każdego z powikłań pacjentów dokonano podziału na trzy grupy: po epizodzie kwasicy ketonowej (DKA) lub hipoglikemii (HG), ze świeżo rozpoznaną cukrzycą (NDM) oraz dzieci z ustabilizowaną cukrzycą (EDM). Od dwóch pierwszych grup pobrano próbki krwi w trzech punktach czasowych (0h-24h-72h, jak określono w przypadku DKA. Punktów czasowych nie sprecyzowano w rozdziale dotyczącym pacjentów HG, zakładam, że przyjęto takie same kryteria poboru krwi). Od pacjentów z EDM

materiał biologiczny pobrano jednokrotnie, gdyż założono brak zmian dynamicznych w stężeniu we krwi metabolitów u tych pacjentów w czasie ich hospitalizacji. Dla porządku można było zastosować taki sam wzór pobrań jak w przypadku dwóch pozostałych grup. Jak już wspomniano wyżej, zastrzeżenia moje budzi rozstrzał wiekowy pacjentów. Co prawda w Tabeli 2 i 8 został ten wiek uśredniony (10-15 lat), nie ma jednakże informacji ilu pacjentów było 2 letnich, a ilu 19 letnich, a w moim odczuciu mogłoby to bardzo wpływać na uzyskane parametry i wnioski.

Obszerny i imponujący opis metod statystycznych nie pozostawia wątpliwości, że otrzymane wyniki są dobrze policzone i wszystkie możliwe zmienne wzięte pod uwagę. Szacunek dla Doktorantki budzi znajomość i opanowanie takiej ilości metod statystycznych oraz umiejętności posługiwania się nimi. Nie wiem, czy istnieje jakaś metoda analizy statystycznej, która nie została wykorzystana do opracowania wyników w tym doktoracie. Pewne wątpliwości rodzi jedynie prawidłowość opisu oraz zastosowania tych testów, jak na przykład zastosowanie testu t-Studenta z poprawką Bonferroniego jako testu post-hoc (strona 24, paragraf 1). Ogólnie ten test jest dość słaby, analiza może być obciążona dużym błędem i co za tym idzie, mogą być nieprawidłowe wyniki.

Bez wątplenia wyniki stanowią najbardziej rozbudowaną i najbogatszą część rozprawy doktorskiej, będąc jednocześnie nie lada wyzwaniem dla recenzenta oraz jego zdolności koncentracji. Wyniki zamieszczono na stronach 26-118. Przedstawione są w sposób wręcz imponujący. Zebranie przez Doktorantkę takiej ilości danych, oraz próba ich usystematyzowania oraz w miarę czytelnego opisanie zasługuje na uznanie, a nawet podziw.

Wyniki opisano w dwóch podrozdziałach. W jednym umieszczono dane od pacjentów z DKA, a w drugim po HG.

W każdym z tych podrozdziałów przedstawiona jest ogólna tabela opisująca pokrótce dobór grup badawczych z uwzględnieniem różnych czynników, takich jak wiek pacjenta, wiek zachorowania, czas trwania cukrzycy oraz niektóre parametry biochemiczne. Po czym następuje opis wyników profilowania metabolomicznego odcisku palca po przebyciu epizodu DKA bądź HG.

Wszystkie wyniki zostały przedstawione na 83 rycinach i w 12 tabelach. Opisy są dość skomplikowane i obszernie. W moim odczuciu są tam pewne niedociągnięcia, jak na przykład jest podany test post-hoc dla ANOVY (np. strona 32, uwaga do analizy post-hoc jak wyżej). W opisie wyników nie podano wartości F dla ANOVY (np. strona 44, 46).

Podpisy pod niektórymi rycinami różnią się czcionką (delikatnie różne odcienie), przez co mieni się w oczach (np. strona 41, 52, 64).

Normalny czytelnik nie jest w stanie „wyłuskać” z ogromnej ilości wyników tego, co jest najważniejsze i jakie zmiany w rezultacie otrzymano. Dlatego po każdym z dwóch podrozdziałów bardzo pomocne byłoby zwięzłe podsumowanie tego, co zostało za pomocą tych obszernych analiz uzyskane. Niestety, takich podsumowań nie ma.

Pewną nadzieję można było pokładać w „Dyskusji”, jednakże jej przeczytanie zawikłało jeszcze bardziej i tak już mocno skomplikowany obraz całości. Ogólnie po przebrnięciu 9 stron tekstu nic nie jest jasne, oprócz tego co zaproponowano na samym wstępie, że jako potencjalny test diagnostyczny przebiegania epizodu DKA przyjęto pomiar lizofosfatydylocholin - LPC (18:1) i sfingomieliny - SM (d18:0/15:0), natomiast dla HG zaproponowano oznaczenie lizofosfatydyloetanolaminy - LPE (20:3) i utlenionej formy fosfatydylocholin - PC-O (34:3).

Tekst dyskusji jest chaotyczny, niespójny, i jest w nim dość dużo zauważalnych błędów interpunkcyjnych oraz stylistycznych (kropka w środku zdania, brak przecinków w oczywistych miejscach), co utrudnia czytelnikowi sam proces czytania. Przykład: strona 118, pierwsze zdanie podrozdziału 6.1; strona 119, 8 linijka podrozdziału 6.2). Ponadto wiele zdań jest zbyt długich. Niektóre zdania są też dość dziwne w swojej treści, jak np. „Prace dotyczące cukrzycy typu 1 są nieliczne i dotyczą głównie porównania osób chorych i zdrowych, (strona 118), albo „pacjent po epizodzie hipoglikemii wykazywali podniesiony poziom LPC, co sugerowałoby efekt „odmłodzenia” organizmu, który nasilał się wraz z wiekiem pacjentów” (strona 120).

Autorka w Dyskusji koncentruje się na wielu aspektach badanych przez siebie metabolitów, począwszy od ich budowy chemicznej, poprzez procesy ich syntezy i rozkładu, do ogólnej roli prawie we wszystkich procesach życiowych (włącznie z prędkością chodzenia [sic!]). Sama też wspomina o niespecyficzności zmian wynikłych z obniżonego stężenia we krwi frakcji LPC, a jako wspólny mianownik wskazuje na wiek. Sugeruje więc, że LPC może być markerem starzenia się organizmu. Ale nie to stanowiło chyba cel Jej badań? W wielu miejscach stara się bronić lub obalać jakieś teorie, o których nie jest do końca jasne, dlaczego są przywoływane w dyskusji. Na końcu często przytacza wnioski, że w sumie to nic nie wiadomo, np. (strona 122 pierwszy akapit). Na tej samej stronie opisuje też wpływ LPC na szereg nowotworów, sugerując pronowotworowe skutki DKA, co jest również opatrzone klauzulą, że brak jest danych na ten temat.

Podobne zarzuty lekkiej chaotyczności w dyskusji można doprzeć się w ocenie wyników pomiaru dotyczących LPE (18:2) i LPE (20:3), a także PC-O.

Reasumując, widać, że Doktorantka dokonała przeglądu literaturowego prolematyki, którą się zajmuje, ma niewątpliwie pogląd na wiele aspektów związanych z cukrzycą, jej powikłaniami, oraz badanymi przez siebie metabolitami, jednakże ta wiedza jest nie do końca usystematyzowana, wymieszana, i dlatego też cała dyskusja nie jest przeprowadzona w sposób syntetyczny, który prowadziłby czytelnika spójną ścieżką myślową.

### Podsumowanie

Należy stwierdzić, że prace badawcze wykonane przez Doktorantkę są bardzo interesujące i nowatorskie, wnoszą nową wiedzę w możliwości aplikacyjnego zastosowania samej metabolomiki, wskazują na potencjalne markery ostrych powikłań cukrzycowych. Wyniki są kompleksowe, przemyślane, obszernie opisane a Doktorantka wykazała się opanowaniem szeregu technik badawczych, co pozwala docenić nakład Jej pracy.

W związku z tym uważam, że praca doktorska Pani lek. med. Beaty Małachowskiej pt. „Profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań cukrzycy typu 1 u dzieci” spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim, zgodnie z obecnie obowiązującymi przepisami. W związku z powyższym zwracam się do Komisji ds. Studiów Doktoranckich i Doktoratów Rady Naukowej w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. med. Beaty Małachowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Leszek Kalinowski*

Prof. dr hab. med. Leszek Kalinowski

