



KLINIKA CHORÓB WEWNĘTRZNYCH I CHORÓB METABOLICZNYCH
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
15-276 Białystok, ul. Marii Skłodowskiej- Curie 24a
Tel. 85 831 7761
Fax: 85 831 77 68
e-mail: klinmet@umb.edu.pl

Kierownik Kliniki Prof. dr hab. Irina Kowalska

Białystok, 23.09.2019 r.

Recenzja

pracy doktorskiej lekarz Beaty Małachowskiej

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

W ostatnich latach obserwujemy istotny wzrost zapadalności na cukrzycę typu 1 (T1DM). Dane z badań epidemiologicznych wskazują, że zła kontrola metaboliczna cukrzycy prowadzi do rozwoju powikłań. Wiele uwagi poświęca się prewencji powikłań zarówno ostrych, jak i przewlekłych. Ostre powikłania cukrzycy mogą wynikać z bezwzględnego lub względnego nadmiaru lub niedoboru insuliny – przy nadmiarze insuliny obserwujemy hipoglikemię, natomiast niedobór insuliny może doprowadzić do cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA). Warto wspomnieć, że DKA jest też często pierwszą manifestacją kliniczną T1DM. Mimo tego, że zarówno diagnostyka jak i sposoby postępowania w przypadku ostrych powikłań cukrzycy są znane, to w populacji pediatrycznej ostre powikłania w dalszym ciągu stanowią istotny problem kliniczny. DKA może doprowadzić do poważnych następstw neurologicznych, również hipoglikemia może stanowić bezpośrednie zagrożenie życia.

Metabolomika jest dynamicznie rozwijającą się gałęzią nauki zaliczaną do tzw. technik „omicznych”, zajmującą się analizą profilu związków o małej masie cząsteczkowej w komórkach i tkankach, celem oceny metabolizmu i zmian w nim zachodzących. Niecelowana analiza metabolomiczna (tzw. „metaboliczny odcisk palca”, *metabolic fingerprint*) pozwala na jakościową

ocenę metabolomu oraz wyodrębnienie metabolitów charakterystycznych dla badanej populacji. Uzyskane w ten sposób informacje mogą następnie posłużyć do przeprowadzenia celowanej analizy metabolomicznej, obejmującej ocenę zależności pomiędzy konkretnymi metabolitami występującymi w określonych szlakach biochemicznych. Celem przedstawionej do oceny pracy doktorskiej jest profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań cukrzycy – DKA i hipoglikemii w populacji pediatrycznej z T1DM. Autorka słusznie zakłada, że zarówno w DKA, jak i hipoglikemii dochodzi do szeregu zaburzeń metabolicznych, które prawdopodobnie zmieniają szlaki metaboliczne w czasie, tak więc profilowanie metabolomiczne wydaje się mieć w tej grupie szczególne uzasadnienie. Biorąc pod uwagę zarówno konsekwencje ostrych powikłań cukrzycy u dzieci, jak też próbę zastosowania nowoczesnej techniki do ich oceny, cel pracy uważam za nowatorski i ważny.

Praca doktorska jest przedstawiona w formie monografii i ma układ typowy. Pracę rozpoczyna wykaz skrótów, następnie rozdziały to - wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz piśmiennictwa, spis tabel, spis rycin oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dysertacja jest obszernym opracowaniem liczącym łącznie 149 stron i pisana jest z pojedynczym odstępem. Muszę podkreślić, że przygotowana jest niezwykle starannie, nie zawiera błędów edytorskich, za co należą się Doktorantce słowa uznania.

We wstępie lekarz Beata Małachowska opisuje epidemiologię ostrych powikłań cukrzycy u dzieci oraz ich kliniczne konsekwencje, dokonując doskonałego przeglądu piśmiennictwa. Następnie dużą część wstępu poświęca metabolomice, wprowadzając czytelnika w tajniki tej nowoczesnej techniki badawczej. Autorka podkreśla znaczenie profilowania niecelowanego i celowanego. Profilowanie niecelowane pozwala na dokonanie odkryć nowych metabolitów i dokonuje się tego przy pomocy połączenia chromatografii cieczowej (LC-liquid chromatography) ze spektrometrią mas (MS-mass spectrometry) – LC-MS. Technika ta została również wykorzystana przy realizacji recenzowanej pracy doktorskiej. Wstęp kończy przegląd badań metabolomicznych w cukrzycy, z którego jasno wynika, że dotyczą one głównie cukrzycy typu 2

(T2DM), a tylko pojedyncze badania - T1DM. Następnie Autorka formułuje cztery główne cele badania, gdzie oprócz oceny zmian stężeń metabolitów wywołanych przez epizod DKA lub epizod hipoglikemii, planuje ocenić zmiany stężeń metabolitów po klinicznym wyrównaniu ostrych powikłań cukrzycy. W dalszym etapie Doktorantka planuje wytypowanie potencjalnych biomarkerów metabolomicznych do oceny epizodu przebytego DKA i hipoglikemii, i w końcu identyfikację zaburzonych szlaków metabolicznych.

Kolejny rozdział – opisujący materiały i metody - napisany jest bardzo przejrzysto. W pierwszej części opisane są kryteria doboru pacjentów do grup. Należy zaznaczyć, że pacjenci byli rekrutowani w sposób prospektywny w Klinice Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie byli hospitalizowani. W ten sposób wyodrębniono dwie grupy badawcze (grupa z kwasica ketonową – DKA, grupa z hipoglikemią – HG) i dwie grupy porównawcze (grupa z nowo rozpoznaną T1DM bez kwasicy ketonowej – NDM, grupa z ustabilizowaną cukrzycą, bez epizodu DKA i hipoglikemii w ciągu ostatnich 3 miesięcy – EDM). Doktorantka opisuje jakie dane kliniczne były zbierane od pacjentów, a następnie bardzo szczegółowo opisuje protokoły pobierania próbek dla poszczególnych grup, zabezpieczenie materiału do badań metabolomicznych. Autorka podkreśla, że odpowiednio zabezpieczone próbki były analizowane w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Jak wspomniano powyżej analizy wykonano za pomocą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas, przestrzegając obowiązujących standardów dla badań metabolomicznych opartych o spektrometrię mas z wykorzystaniem kontroli jakości. Wyniki uzyskane w materiale biologicznym porównywano z danymi z baz danych z ludzkiego metabolomu (HMDB) oraz innych baz - METLIN i LIPID MAPS. Celem ostatecznej identyfikacji związków wykorzystano chromatografię cieczową z tandemową spektroskopią mas(LC-MS/MS). Uzyskane wyniki poddano właściwej analizie statystycznej. Pragnę podkreślić, że zastosowano zaawansowane metody statystyczne, za które Doktorantce jak też Promotorowi należą się słowa uznania.

Wyniki stanowią najobszerniejszą część dysertacji doktorskiej i przedstawione są na 91 stronach. Zrozumienie wyników ułatwiają przejrzyste tabele (11 tabel) i ryciny (81 rycin). Sposób przedstawienia i opisanie wyników wyraźnie wskazuje jak nowoczesną techniką badawczą posługiwała się Doktorantka i w jaki sposób analizowała wyniki. Uzyskane wyniki z profilowania metabolomicznego przedstawiono oddzielnie dla DKA i hipoglikemii, ale sposób analizy wyników był jednakowy dla obu ostrych powikłań cukrzycy. W każdym z badanych ostrych powikłań wyniki rozpoczyna charakterystyka kliniczna grup, która w przypadku DKA dotyczyła 20 pacjentów z DKA, 10 pacjentów z NDM i 10 pacjentów z EDM. Następnie Doktorantka przedstawia w kolejności wyniki niecelowanego profilowania metabolicznego w jonizacji pozytywnej i jonizacji negatywnej. Z obu jonizacji wytypowano łącznie 22 cechy metaboliczne jako proponowane markery przebytego epizodu DKA, które utrzymywały się w materiale biologicznym do 72h po przeżytym epizodzie DKA i różnicowały grupę z DKA w porównaniu do pozostałych grup. W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano ostatecznie 4 związki chemiczne – 3 o podwyższonym stężeniu po przeżytym epizodzie DKA i 1 o obniżonym stężeniu. Do związków o podwyższonym stężeniu należały: lizofosfatydylocholina (LPC) (18:1), sfingomielina (SM) (34:0), sfingomielina (d18:0/15:0), a o obniżonym stężeniu – LPC (18:0). Kolejnym krokiem była próba odpowiedzi na pytanie dotyczące potencjalnych biomarkerów metabolomicznych, charakteryzujących przeżyty epizod DKA. W oparciu o uzyskane wyniki testem o największej czułości (95%) i swoistości (80%) okazał się test składający z oznaczeń dwóch związków – LPC(18:1) i SM (d18:0/15:0). W dalszym etapie podjęto próbę identyfikacji komórkowych szlaków metabolicznych (z wykorzystaniem programu Metaboanalyst), które uległy zaburzeniu w wyniku epizodu DKA. I tak zwiększoną aktywację obserwowano w przypadku metabolizmu kwasu arachidonowego, powstawania prostaglandyn z arachidonianu, powstawanie z EPA metabolitów przeciwzapalnych; natomiast zmniejszoną aktywację obserwowano w przypadku szlaku metabolizmu sfingolipidów.

Podobną analizę wyników przedstawiono dla epizodów HG. W przypadku HG badanie przeprowadzono w następujących grupach: 10 pacjentów z HG, 15 pacjentów z NDM i 25 pacjentów z EDM. Z obu jonizacji (pozytywnej i negatywnej) wytypowano łącznie 9 cech metabolicznych jako proponowane markery przebytego epizodu HG, które utrzymywały się w materiale biologicznym do 48h po przebytych epizodzie HG. W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano podobnie jak w przypadku epizodu DKA ostatecznie 4 związki chemiczne – 3 o podniesionym stężeniu po przebytych epizodzie HG i 1 o obniżonym stężeniu. Do związków o podwyższonym stężeniu należały: lizofosfatydyloetanolina (LPE) (18:2), LPE (18:3) i LPC (18:2), a o obniżonym stężeniu – utleniona fosfatydylocholina (PC O-(34:3)). Jako potencjalny biomarker metabolomiczny, charakteryzujących przebyty epizod HG zaproponowano test składający się z oznaczeń dwóch związków – LPE (20:3) i PC O-(34:3) (czułość- 90% i swoistość - 80%). Zidentyfikowano również komórkowe szlaki metaboliczne, które uległy zaburzeniu w wyniku przebytego epizodu HG. Obserwowano dezaktywację szlaku metabolizmu kwasu arachidonowego, metabolizmu i biosyntezy hormonów steroidowych, szlaku fosforylacji heksoz oraz szlaku metabolizmu sfingolipidów.

Kolejny rozdział to dyskusja wyników. Również ta część dysertacji napisana jest doskonale. Doktorantka miała trudne zadanie, ponieważ w zasadzie brak jest badań dotyczących profilowania metabolomicznego po przebytych epizodach ostrych powikłań cukrzycy u dzieci - DKA czy HG. Z zadaniem tym poradziła sobie jednak doskonale. Kolejno omawia poszczególne związki, które w profilowaniu niecelowanym wykazywały charakter biomarkerów metabolomicznych, próbuje wytłumaczyć ich rolę w przebiegu ostrych powikłań cukrzycy, zaproponować potencjalne znaczenie kliniczne. Kolejna ważna część dyskusji to krytyczna analiza zastosowanych metod badawczych (ograniczenia metabolomiki) statystycznych czy uzyskanych wyników. Świadczy to o dużej dojrzałości i dobrym przygotowaniu do pracy naukowej lekarz Beaty Małachowskiej. Pracę kończą uzasadnione wnioski przedstawione w formie opisowej.

Nie zgłaszam krytycznych uwag do pracy. Uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska jest bardzo ciekawym opracowaniem dotyczącym profilowania metabolomicznego ostrych powikłań cukrzycy u dzieci z T1DM. Z pełnym przekonaniem pragnę podkreślić, że praca została zarówno zaprojektowana, zrealizowana jak i przedstawiona w sposób wzorcowy i zasługuje na wyróżnienie. We wstępie Doktorantka bardzo ciekawie uzasadniła proponowane hipotezy badawcze, następnie jasno sformułowała cele, wyczerpująco opisała zastosowane metody. W kolejnych etapach - sposób przedstawienia wyników odpowiadał postawionym kolejno celom badawczym, a ich dyskusja potwierdziła doskonałą znajomość tematu przez lekarz Beatę Małachowską. Pragnę wyrazić uznanie Doktorantce i Promotorowi za ogromny wkład pracy związany z realizacją tej pracy doktorskiej i gratuluję tak pięknego opracowania.

Wniosek końcowy

W opinii recenzenta praca doktorska lekarz **Beaty Małachowskiej** spełnia wszystkie warunki określone dla prac doktorskich *Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki*. W związku z tym przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie **lek. Beaty Małachowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wybitnie nowatorski charakter pracy, oryginalność w wyborze tematu badawczego, zastosowanie nowoczesnych trudnych technik badawczych, umiejętność interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników - wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. Irina Kowalska

I. Kowalska