



GDAŃSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

www.gumed.edu.pl

58 349 11 11

info@gumed.edu.pl

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk

KATEDRA I KLINIKA PEDIATRII, DIABETOLOGII I ENDOKRYNOLOGII

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Małgorzata Myśliwiec

ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
fax. 058/ 349/ 28 48
tel. 058/ 349 28 98

mail: pdiabend@gumed.edu.pl

Gdańsk, dnia 19.10.2023 r.

Recenzja

pracy na stopień doktora nauk medycznych

lek. Anny Baranowskiej-Jaźwieckiej

p.t. „Analiza związku pomiędzy stężeniem hemoglobiny glikowanej (HbA1c) a wybranymi parametrami krwinki czerwonej u dzieci w cukrzycy typu 1”

Przedstawiona mi do oceny praca obejmuje: 99 stron tekstu, 253 pozycji cytowanego piśmiennictwa. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje: Wstęp (str. 11-33), Cel pracy (str. 32), Materiały i metody badania (str. 33-41), Wyniki (str. 42-64), Dyskusję (str. 65-72), Wnioski (str. 73). W pracy zawarto również: Spis treści, Spis rycin, tabel, Wykaz skrótów oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim (str. 7-8).

Cel pracy został przedstawiony jasno i precyzyjnie. Lek. Anna Baranowska-Jaźwiecka podjęła próbę odpowiedzi na pytanie czy istnieje związek pomiędzy zmiennością wybranych parametrów czerwonych krwinek, a stężeniem hemoglobiny HbA1c u dzieci z cukrzycą typu 1.

Oryginalną częścią postawionego celu pracy była ocena związku zmienności parametrów czerwonych krwinek i stężenie hemoglobiny płodowej (HbF) oraz hemoglobiny A2 (HbA2) a stężeniem HbA1c oraz analiza związku wybranych czynników genetycznych wpływających na stężenie HbF i HbA2 a stężeniem HbA1c u dzieci z cukrzycą typu 1.

Obszerny wstęp prezentuje współczesną wiedzę, w oparciu o aktualne piśmiennictwo w zakresie epidemiologii, etiopatogenezy cukrzycy typu 1, kosztów jej leczenia, szczególnie powikłań rozwijających się w trakcie jej trwania.

W dalszej części wstępu Doktorantka opisuje parametry wskazujące na poziom wyrównania cukrzycy z wykorzystaniem produktów glikacji, w tym hemoglobinę glikowaną, fruktozaminę i albuminę glikowaną.

Dużą część wstępu lek. Anna Baranowska-Jaźwiecka poświęca przede wszystkim hemoglobinie glikowanej, która od lat 80 XX wieku jest wykorzystywana w pracach naukowych i praktyce klinicznej jako główny parametr wyrównania metabolicznego cukrzycy. Doktorantka przytacza przykład badania klinicznego DCCT, które zostało przeprowadzone w latach 90-tych udawadniające, że intensywne insulinoterapie odzwierciedla w pomiarze HbA1c wpływ na spowolnienie postępu powikłań mikronaczyniowych wywołanych przez cukrzycę. Udowodniono, że stężenie HbA1c jest niezależnym predyktorem chorób sercowo-naczyniowych. Ponadto podkreśla, że w wielu krajach świata stosuje się HbA1c do rozpoznania cukrzycy, a przy stężeniu 5,7-6,5% stan przedcukrzycowy.

Lek. Anna Baranowska-Jaźwiecka słusznie zauważa, że oznaczenie HbA1c ma jednak pewne ograniczenia wynikające z wpływu czynników niezależnych od glikemii na jej stężenie, w tym wymienia anemię, splenektomię, niedobór żelaza, witaminy B12, kwasu foliowego, hiperbilirubinemię, choroby tarczycy, leczenie kwasem acetylosalicylowym, witaminą C. Różnice w stężeniu HbA1c podkreśla, że wynikają też z różnic płciowych, rasowych, etnicznych. Ponadto słusznie zauważa Doktorantka, że oznaczenie stężenia HbA1c nie odzwierciedla prawidłowych poziomów glikemii, a jedynie średnie ich poziomy i nie świadczy o poziomie wyrównania metabolicznego cukrzycy. Wprowadzenie od 2000 roku systemów ciągłego monitorowania glikemii (CGM) pozwoliły na uzyskaniu nawet 290 pomiarów glikemii bez udziału pacjenta. Dzięki ich refundacji w 2018 roku w populacji pediatrycznej w Polsce obecnie korzysta z nich niemal 70% dzieci i młodzieży z cukrzycą. Systemy ciągłego monitorowania glikemii nie tylko zwiększają jakość życia pacjentów poprzez eliminację bolesnych, czasochłonnych, stygmatyzujących pomiarów glikemii za pomocą glukometrów, ale umożliwiają poprawę ich wyrównania metabolicznego bez zwiększenia ryzyka hipoglikemii poprzez obecność strzałek trendów, które pozwalają pacjentom z wyprzedzeniem reagować na incydenty zarówno hipo- jak i hiperglikemii. Doktorantka we wstępie podkreśla też inną rolę zastosowania CGM u pacjentów z cukrzycą, wygenerowania nowych parametrów wyrównania metabolicznego choroby, między innymi TIR (czas w zakresie docelowym), CV (zmiennosc glikemii), TBR (czas poniżej zakresu

docelowego), TAR (czas powyżej zakresu docelowego), które dokładnie precyzują poziomy glikemii, znacznie dokładniej niż stężenie HbA1c.

Doktorantka jednak podkreśla, że pomimo coraz silniejszego trendu oceny TIR i CV w praktyce i badaniach klinicznych HbA1c nadal jeszcze jest podstawowym punktem końcowym interwencji w populacji pacjentów z cukrzycą szczególnie u osób dorosłych, uwzględniając ich ograniczenia finansowe, intelektualne, reakcje miejscowe na założony sensor oraz brak tolerancji urządzeń na stałe przypiętych do ich ciała.

Dlatego podjęte przez lekarz badania oceniające wpływ niektórych parametrów czerwonych krwinek na stężenie HbA1c u dzieci z cukrzycą typu 1 jest istotne i nadal aktualne.

Badaniami objęto początkowo 819 dzieci z cukrzycą typu 1. Kryterium rozpoznania choroby przyjęto w oparciu o Wytyczne Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego z 2021 roku. Mając na uwadze, że glikemia nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na stężenie HbA1c Doktorantka projektując swoje badania słusznie wykluczyła z grupy badanej wszystkich pacjentów, którzy potencjalnie mieli istotne niezależne od glikemii, znane dotychczas czynniki wpływające na wartość HbA1c. Ostatecznie do badania włączono 393 dzieci z cukrzycą typu 1. Grupą kontrolną byli pacjenci przyjmowani do szpitala celem badań kontrolnych lub diagnostyki nieobciążonych cukrzycą.

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr RNN/116/18/KE z dnia 10 kwietnia 2018 roku).

Rodzaj i ilość przeprowadzonych badań była imponująca. U wszystkich zakwalifikowanych do badań dzieci wykonano w trakcie rutynowych wizyt w poradni i/lub podczas hospitalizacji co najmniej trzykrotnie w ciągu 12 miesięcy jednoczasowy pomiar stężenia HbF, HbA2 i HbA1c (przy pomocy referencyjnej metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z użyciem aparatu Bio-Rad D-10, przy użyciu krwi włośniczkowej. U pacjentów z grupy kontrolnej dokonano jednokrotnego pomiaru wyżej wymienionych parametrów. Co najmniej 1 raz w roku podczas obserwacji zostało wykonane badanie morfologii krwi obwodowej metodą fluorescencyjną, co pozwoliło na uzyskanie wartości stężenia hemoglobiny całkowitej, liczby krwinek czerwonych, hematokrytu oraz MCHC, MCH, MCV.

Dodatkowo przy każdej wizycie:

- dokonano pomiaru wysokości i masy ciała, obwodu talii i bioder,
- określono średnie glikemie, średnie liczby pomiarów, odchylenie standardowe
- określono dobową dawkę insuliny dla okresu poprzedzającego pomiar o 1 miesiąc
- określono rodzaj insulinoterapii,

- oznaczono stężenie TSH, fT4,

Oryginalną częścią rozprawy doktorskiej było wyodrębnienie z grupy badanej 49 pacjentów z podwyższonym stężeniem HbF, 34 z pojedynczymi podwyższonymi stężeniami HbF i 143 pacjentów z prawidłowym stężeniem HbF. Dodatkowo przy jednej z pierwszych wizyt była pobrana próbka krwi pełnej do badań molekularnych, z której DNA izolowano za pomocą rutynowej metody kolumnowej. W dalszej kolejności analizowano polimorfizm rs766432 i rs1886868 genu BCL11A i polimorfizm rs9399137 regionu genów HBS1L-MYB metodą amplifikacji PCR ze znakowanymi fluorescencyjnie oligonukleotydami przy użyciu sprzętu analitycznego Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii UM w Łodzi.

Zaprogramowane w ten sposób badania przez lek. Annę Baranowską-Jaźwiecką wniosły szereg istotnych i nowatorskich spostrzeżeń, ważnych przede wszystkim z punktu widzenia klinicznego.

Należy jeszcze raz podkreślić, że Doktorantka wprowadzając bardzo dokładnie przemyślane kryteria włączenia i wyłączenia w badanej grupie maksymalnie zniwelowała zaburzający wpływ innych czynników poza badanymi i związanymi z glikemią na stężenie HbA1c.

Doktorantka potwierdziła wcześniejsze opublikowane dane z 2019 roku świadczące, że populacja polskich dzieci chorych na cukrzycę typu 1 jest lepiej wyrównana metabolicznie niż dzieci w innych krajach świata. W ocenianej pracy wynik HbA1c wynosił 7,5%. Na pewno zastosowanie coraz w większej grupie dzieci chorych na cukrzycę typu 1 nowoczesnych technologii, w tym osobistych pomp insulinowych i systemów ciągłego monitorowania glikemii (CGM) często zintegrowanymi z tymi pompami pozwoli wkrótce uzyskać jeszcze lepszy wynik wyrównania metabolicznego choroby wśród chorych na cukrzycę w Polsce. **Doktorantka potwierdza to przypuszczenie wskazując, że w Jej ośrodku łódzkim w 2019 roku stężenie HbA1c wynosiło 7,24%. Niewątpliwie ośrodek łódzki, który jest prowadzony przez wybitne osoby, jak Pani Prof. Agnieszka Szadkowska, a wcześniej razem z Panem prof. Wojciechem Młynarskim jest przykładem ośrodka wiodącego we wprowadzaniu nowoczesnej diagnostyki i terapii u dzieci chorych na cukrzycę.**

W dalszej części prawidłowo prowadzonej dyskusji w oparciu o aktualne piśmiennictwo Doktorantka słusznie tłumaczy, że w okresie dojrzewania u pacjentów następuje pogorszenie wyrównania metabolicznego choroby w związku zmniejszającej się możliwości nadzoru rodzicielskiego w połączenie z niedojrzałymi jeszcze umiejętnościami osobistymi wraz z tzw. „burzą hormonalną”, będącą etapem prawidłowego procesu

dojrzewiania pacjentów. Doktorantka w swoich badaniach wykazała dodatnią korelację pomiędzy stężeniem HbA1c a wiekiem pacjenta i czasem trwania choroby. Ponadto udokumentowała zależność pomiędzy częstością badań poziomów glikemii a stopniem wyrównania metabolicznego mierzonego stężeniem HbA1c. Natomiast nie zaobserwowała, co jest zgodne z danymi z literatury, zależności stężenia HbA1c od płci pacjentów.

Istotną częścią niniejszej rozprawy doktorskiej zdaniem recenzenta było wykazanie przez Doktorantkę istotną statystycznie, a dotychczas nieobserwowaną w literaturze zależność pomiędzy stężeniem HbA1c a stężeniem hemoglobiny HbA2, której nie potwierdzono w grupie kontrolnej. Tą zależność Doktorantka tłumaczy, że w grupie badanej z uwagi na występowanie cukrzycy stężenie hemoglobiny glikowanej, średniej glikemii oraz zmienność glikemii była znacznie wyższa niż w grupie kontrolnej. Dalsza analiza statystyczna wieloczynnikowa i modelami mieszanymi potwierdziła wpływ na stężenie HbA1c hemoglobiny A2. Warto podkreślić, że wpływ ten nie był dotychczas opisany w piśmiennictwie.

Interesującą dla recenzenta częścią niniejszej rozprawy doktorskiej była także obserwacja odwrotnej zależności pomiędzy stężeniem HbA1c a wartością stężenia FT4, szczególnie kiedy wiadomo, że prawie 30% pacjentów z cukrzycą typu 1 rozwija autoimmunologiczne zapalenie tarczycy i subkliniczną niedoczynność tarczycy, co przekłada się na zwiększone w przebiegu choroby ryzyko hipoglikemii oraz większą zmienność glikemii mających wpływ na rozwój ostrych i przewlekłych powikłań cukrzycy.

Ogromną wartością przeprowadzonych badań było także wyjaśnienie zmienności stężenia HbA1c, HbA2 i HbF poprzez zmienność genetyczną. W tym celu Doktorantka przeprowadziła analizę literaturową w poszukiwaniu loci genomowych związanych ze stężeniem hemoglobin. W grupie badanej zaobserwowała istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem HbF a polimorfizmem rs9399137 regionu genów HBS1L-MYB, co jest najczęściej opisywanym wpływem genetycznym na wartość tego parametru. Pozostałe badane polimorfizmy nie wykazały w badanej grupie zmienności stężenia HbF, jak tłumaczy Doktorantka, wynika to z niskich wartości tego parametru. **Oryginalną obserwacją niniejszej rozprawy doktorskiej, która dotychczas nie była opisana w literaturze, jest zaobserwowana istotna statystycznie zależność stężenia HbA1c z polimorfizmem rs9399137 regionu genów HBS1L-MYB, analogicznie do HbF. Doktorantka jednak sama stwierdza, że ograniczeniem pracy jest to, że analiza genetyczna była przeprowadzona tylko u części pacjentów, dlatego w przyszłości uzyskane wyniki powinny być walidowane w kolejnych niezależnych badaniach na większej grupie pacjentów.**

Spośród licznych uzyskanych przez Doktorantkę wyników przeprowadzonych badań na uwagę zasługują następujące istotne spostrzeżenia:

1. Stężenie HbA2 jest niezależnym od zmienności glikemii czynnikiem wpływającym na stężenie glikowanej hemoglobiny HbA1c w populacji dzieci chorych na cukrzycę typu 1.
2. Funkcja endokrynną tarczycy wpływa na stężenie glikowanej hemoglobiny w populacji dzieci z cukrzycą typu 1 bezpośrednio poprzez wpływ na wyrównanie metaboliczne choroby lub pośrednio poprzez regulację ekspresji łańcuchów hemoglobiny HbA2.
3. Zmienność genetyczna modulująca ekspresję łańcuchów hemoglobiny może wpływać na stężenie HbA1c w populacji dzieci z cukrzycą typu 1.

Końcowe wnioski oceniającego:

1. Praca stanowi prawidłowo napisaną publikację, w której w oparciu o badania biochemiczne, immunologiczne i genetyczne oraz analizę cech klinicznych pacjentów z cukrzycą typu 1 dokonano odpowiedzi na pytanie czy istnieje związek pomiędzy zmiennością wybranych parametrów czerwonych krwinek, a stężeniem HbA1c u dzieci z cukrzycą typu 1.
2. Doktorantka potrafiła powiązać wyniki badań biochemicznych, immunologicznych i genetycznych ze stanem klinicznym pacjentów z cukrzycą typu 1 i sprecyzować wnioski wynikające z tych współzależności. Świadczy to o dużym zaangażowaniu osobistym Doktorantki w realizację badań i dobrej współpracy z zespołem w Klinice.
3. Prezentacja wyników badań własnych, w tym tabele i ryciny stanowią wzorowo przygotowaną dokumentację naukowo-badawczą.
4. Wstęp do pracy i na wysokim poziomie przeprowadzona dyskusja świadczą o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki oraz Jej wiedzy w zakresie cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży oraz umiejętności precyzowania spostrzeżeń i wniosków wynikających z przeprowadzonych badań pod wnikliwym i profesjonalnym „okiem” Pana Profesora Wojciecha Młynarskiego, Pani Profesor Agnieszki Szadkowskiej, Kierownika Kliniki o ogromnym doświadczeniu diabetologicznym oraz Pana Doktora Arkadiusza Michalaka, który przeprowadził profesjonalną analizę statystyczną.

Nie mam żadnych uwag krytycznych. Jedynie w przygotowywanej publikacji warto posługiwać się tym samym określeniem, stężenie HbA1c. W pracy zamiennie pisane jest stężenie i wartość HbA1c.

Moja ocena pracy na stopień doktora nauk medycznych lek. Anny Baranowskiej-Jaźwieckiej jest wysoce pozytywna, spełnia ona wszelkie warunki określone zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o tytule naukowym i stopniach i tytule w zakresie sztuki wnioskuję o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi lek. Anny Baranowskiej-Jaźwieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz równocześnie **wnioskuję o wyróżnienie pracy „Analiza związku pomiędzy stężeniem hemoglobiny glikowanej (HbA1c) a wybranymi parametrami krwinki czerwonej u dzieci w cukrzycy typu 1”, ponieważ stanowi ona cenny wkład kliniczny w dziedzinie chorób diabetologicznych.**

Wykazane przez Doktoranta w czasie realizacji pracy doktorskiej prawidłowe myślenie, wysoce profesjonalne wykorzystanie dostępnych badań biochemicznych i genetycznych dla rozwiązywania postawionych sobie zadań badawczych oraz poprawność merytoryczna i rzetelność ich wykonania, uzasadniają wniosek o wyróżnienie wyżej wymienionej pracy.

K I E R O W N I K
Katedry i Kliniki Endokrynologii,
Diabetologii i Endokrynologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
prof. dr hab. n. med. *[Signature]*