

OCENA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MAGISTER MARCELINY GRABOWSKIEJ

„Odpowiedź immunologiczna u dzieci z cukrzycą typu 1 leczonych adoptywnie limfocytami T regulatorowymi CD3(+)CD4(+)CD25(high)CD127(-)”

Rozpoznanie cukrzycy typu 1 powoduje duże zmiany w życiu dotkniętych nią pacjentów i ich rodzin. Praktycznie główną i najczęściej jedyną możliwością leczenia tej choroby jest stosowanie egzogennej insuliny czyli uzupełnienie bezwzględnego braku tego hormonu spowodowanego przez nieodwracalne zniszczenie komórek beta trzustki w procesie autoimmunologicznym. Terapia insuliną jest procesem przewlekłym, niefizjologicznym, wymagającym znacznej modyfikacji stylu życia naszych pacjentów, którzy muszą je całkowicie podporządkować chorobie. Dlatego tak istotnym zagadnieniem jest poszukiwanie nowych metod leczenia cukrzycy typu 1. Za jedno z najważniejszych badań w tym zakresie należy uznać nowatorskie prace Promotora niniejszego doktoratu. Przedmiotem ocenianej pracy była m.in. ocena odpowiedzi immunologicznej u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 poddanych eksperymentalnej metodzie leczenia polegających na infuzji uprzednio namnożonych ex vivo limfocytów T regulatorowych. Dwuletniej obserwacji poddanych zostało dwadzieścioro dwoje dzieci, spośród których 12 pacjentów poddanych zostało procedurze leczniczej z zastosowaniem dwóch protokołów podaży limfocytów Treg. Uważam, że podjęcie w niniejszej dysertacji przez Panią mgr Marcelinę Grabowską próby oceny odpowiedzi immunologicznej oraz identyfikacji czynników mających wpływ na skuteczność eksperymentalnej metody terapii komórkami Treg cukrzycy typu 1, to zadanie niezwykle ważne, tak pod względem poznawczym, jak i klinicznym.

Rozprawa przedstawiona do oceny posiada konstrukcję typową dla prac doktorskich i składa się z siedmiu podstawowych części tj. wstępu, sformułowania celu pracy, opisu metodyki i protokołu badania, prezentacji wyników, dyskusji, streszczenia i wykazu piśmiennictwa. W opinii recenzenta dobrym rozwiązaniem byłoby dodanie jeszcze jednego rozdziału - „Wnioski”, gdzie Doktorantka mogłaby w skrótowy i syntetyczny sposób, częściowo przenosząc je z rozdziału „Dyskusja”, odnieść się do celów swojej pracy.

Wstęp pracy w klarowny sposób przybliży czytelnikowi zasadniczą problematykę cukrzycy typu 1 z zakresu jej epidemiologii, etiopatogenezy ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów immunologicznych oraz wpływu genetyki. Autorka przejrzyście przedstawiła podstawę diagnostyki, a następnie zwięźle opisała funkcję oraz znaczenie limfocytów w tym T regulatorowych w patofizjologii chorób autoimmunologicznych w tym cukrzycy typu 1. Wstęp pracy podkreśla szeroką wiedzę doktorantki dotyczącej badanej problematyki, stanowi bardzo dobre wprowadzenie do zagadnienia i jest solidną podstawą dla dalszych części rozprawy.

Cele pracy są przedstawione dość jasno. Są nimi: ocena odpowiedzi immunologicznej po zastosowaniu terapii Treg i identyfikacja czynników mających wpływ na skuteczność leczenia.

Szeroko i w detalach opisana jest metodologia badania. Na uwagę zasługuje szeroki warsztat laboratoryjny doktorantki: znajomość wielu technik z zakresu biologii molekularnej, analityki biochemicznej i immunologicznej.

Wyniki badania w badanych grupach zostały przedstawione w sposób przejrzysty z wykorzystaniem dobrze opisanych 26 wykresów. Najważniejsze z nich, które mają istotne znaczenie kliniczne, to wpływ opisywanej interwencji na wydłużenie okresu remisji choroby oraz poprawę funkcji komórek beta trzustki

Pani mgr Marcelina Grabowska wykazuje umiejętność posługiwania się narzędziami statystycznymi, interpretacji oraz krytycznego podejścia do uzyskanych rezultatów.

W dyskusji doktorantka zwraca uwagę na bezpieczeństwo stosowanej terapii, podsumowuje wyniki, polemizuje z nimi szeroko cytując piśmiennictwo. Próbuje identyfikować parametry będące przedmiotem pracy jako elementy wpływające na skuteczność terapii. Wskazuje na problemy i kierunki dalszych badań mogących poprawić efektywność opisywanej metody leczenia.

Streszczenie właściwie prezentuje najważniejsze zagadnienia poruszane w rozprawie.

Piśmiennictwo obejmuje 136 pozycji, jest obszerne, trafnie dobrane i przytoczone.

UWAGI

1. We wstępie błędem wydaje się zamienne stosowane przez doktorantkę pojęcia cukrzyca typu 1 i cukrzyca insulinozależna. To ostatnie stosowane w międzynarodowej klasyfikacji ICD10 ma znacznie szersze znaczenie i obejmuje również postacie cukrzycy typu 2 oraz cukrzycy, w której doszło do innego niż autoimmunologicznie uszkodzenie trzustkowych wysp B.
2. W danych epidemiologicznych dotyczących rozpowszechnienia cukrzycy typu 1 doktorantka zwróciła uwagę na wzrost pacjentów leczonych insuliną jako parametr świadczący w domyśle o występowaniu cukrzycy typ 1 w Polsce. Dane te mogą jednak wynikać także ze zwiększenia występowania cukrzycy typu 2 i stosowania insuliny w terapii u tych chorych.
3. Praca jest w języku polskim, w związku z tym opisy w rysunku 1 również powinny być w języku polskim. Ostatnia kolumna tabeli nr 2 jest niejasna – zawiera skróty myślowe i brakuje odniesienia do wierszy.
4. We wstępie lub w dyskusji podczas omawiania wyników należałoby bardziej szczegółowo opisać znaczenie subpopulacji Treg (naiwne, pamięci centralnej i efektorowej) w patofizjologii chorób autoimmunologicznych oraz ich potencjalne znaczenie dla odpowiedzi terapeutycznej.
5. W rozdziale „Cele” punkt 3 czyli oszacowanie związków antygenów HLA z przebiegiem terapii Treg jest w sumie częścią celu opisanego w punkcie 2

- czyli jednym z czynników mających potencjalny wpływ na skuteczność leczenia.
6. W protokole badawczym opisującym punkty czasowe pobrania od pacjentów materiału podlegającego analizie immunologicznej nie jest jasno powiedziane co oznacza punkt czasowy „0” – czy jest to pobranie przed czy po infuzji limfocytów Treg, a jeśli po, to w jakim czasie?
 7. W tabeli zestawiającej i charakteryzującej porównywane grupy brakuje danych dotyczących wyjściowego poziomu C-peptydu.
 8. W rozdziale „Wyniki” w podrozdziale analizującym funkcję komórek beta trzustki wskazane byłoby umieszczenie na początku podrozdziału jasnej definicji i parametrów tej oceny.
 9. U pacjentów poddanej terapii pojedynczym wlewem Treg wyjściowy poziom C-peptydu wydaje się wyższy niż w grupie kontrolnej. Stężenie tego parametru u połowy grupy badanej jest równe lub wyższe aniżeli maksymalne stężenie w grupie kontrolnej. Brak różnicy statystycznej najpewniej wynika z małej liczebności grupy i dużej niejednorodności stężenia C-peptydu w grupie poddanej interwencji. Ten aspekt w opinii recenzenta powinien znaleźć swoje odzwierciedlenie w dyskusji jako potencjalnie wpływający na wynik badania.
 10. W dyskusji i formułowaniu wniosków zbyt odważne wydaje się stwierdzenie, że terapia adoptywna chroni wyspy przed procesem autoimmunologicznym – na podstawie wyników pracy bardziej neutralnym jest stwierdzenie, iż terapia ta zmniejsza natężenie procesu autoimmunologicznej destrukcji wysp beta.
 11. Czytelnikowi znacznie pomogłaby numeracja piśmiennictwa.
 12. Doktorantka nie ustrzegła się przed błędami literowymi, gramatycznymi oraz stylistycznymi, które winny być skorygowane przed oddaniem pracy do druku.

Powyższe uwagi nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę rozprawy. Praca doktorska mgr Marceliny Grabowskiej jest oryginalna, poświęcona niezwykle ciekawej tematyce, zrealizowana z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi

badawczych i ma ogromne znaczenie praktyczne. Wyniki rozprawy, zwłaszcza te, które dotyczą wpływu infuzji Treg na funkcję komórek beta trzustki wnoszą istotny postęp w zrozumienie odpowiedzi na leczenie adoptywne w cukrzycy typu 1 i zapewne będą miały wpływ na dalsze udoskonalenie protokołu tej eksperymentalnej terapii. Ponadto część rezultatów powyższej dysertacji została już opublikowana w uznanych czasopismach międzynarodowych.

Stąd też w oparciu o powyższą opinię wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Marceliny Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk 13.02.2017

Dr hab. n. med. Michał Hoffmann

