



## Ocena

rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych, lekarz **Anny Wołoszyn-Durkiewicz pt.:** "Wybrane cytokiny w diagnostyce prognostycznej powikłań naczyniowych u pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy typu 1 oraz odniesienie stopnia nasilenia powikłań do sposobu leczenia", promotor: prof. dr hab. n. med. Małgorzata Myśliwiec

Cukrzyca typu 1 jest jedną z najczęstszych chorób przewlekłych wieku dziecięcego. Wzrastająca zapadalność na cukrzycę typu 1 wśród coraz młodszych dzieci wydłuża czas trwania choroby, zwiększa ryzyko powstania i ujawnienia się jej powikłań jeszcze w wieku rozwojowym. Czynniki ryzyka rozwoju powikłań, ich markery oraz możliwości wczesnej diagnozy i leczenia pozostają cały czas w sferze zainteresowań naukowych. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że liczne cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu są zaangażowane w rozwój angiopatii. Mechanizm ich działania wciąż nie jest do końca wyjaśniony, a zastosowanie nowych terapii, takich jak podaż limfocytów T-regulatorowych (Tregs), może wpłynąć na środowisko cytokin. Terapia Tregs pozwala wydłużyć okres remisji u pacjentów z T1D poprzez zachowanie funkcji komórek  $\beta$  wciąż produkujących insulinę. Długotrwałe efekty i wpływ leku na rozwój powikłań naczyniowych pozostają nieznanymi i wymagają dalszych badań i obserwacji. Należy podkreślić, że tylko wczesne powikłania naczyniowe cukrzycy są odwracalne na początkowym etapie ich rozwoju, co sprawia, że poszukiwanie klinicznie istotnych powikłań takich jak albuminuria, neuropatia lub retinopatia wydaje się być spóźnione. Praca lekarza Anny Wołoszyn-Durkiewicz dotyczy zatem bardzo ważnego i aktualnego tematu, jakim stała się ocena wybranych cytokin w diagnostyce prognostycznej powikłań naczyniowych u młodych pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy typu 1, w odniesieniu do sposobu leczenia, z uwzględnieniem terapii wspomnianej immunomodulującej.

Praca została wykonana w Katedrze i Klinice Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ośrodka o wieloletniej tradycji pionierskich badań nad markerami powikłań przewlekłych, ale przede wszystkim prowadzącym badania na światowym poziomie a dotyczące terapii komórkami Tregs w młodej populacji.

A handwritten signature in blue ink, located in the bottom right corner of the page.

Przedstawiona mi do oceny praca ma układ typowy dla rozprawy na stopień doktora. Rozprawa liczy w sumie 139 stron, w tym 10 tabel i 31 rycin w tekście podstawowym. Obejmuje kolejno szczegółowy spis treści, wykaz skrótów stosowanych w pracy, wstęp, założenia i cele pracy, rozdział materiał i metody, wyniki badań, omówienie wyników i dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Lekarka Anna Wołoszyn-Durkiewicz powołuje się na 181 pozycji aktualnego i w znacznym stopniu anglojęzycznego piśmiennictwa, a swoje wyniki omawia również w oparciu o kluczowe dla tematu piśmiennictwo pochodzące z własnego ośrodka.

We wstępie, liczącym 13 stron, Doktorantka w bardzo przejrzysty i skondensowany sposób opisuje na początku podstawowe informacje o cukrzycy typu 1, aktualne konwencjonalne sposoby terapii choroby oraz metodykę i efekty terapii z zastosowaniem komórek T regulatorowych, prowadzoną w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym już od 2007 roku. Doktorantka opisuje powikłania naczyniowe będące następstwem choroby trwającej wiele lat. W dalszej części wstępu sporo miejsca poświęca roli cytokin, chemokin i czynnikom wzrostu w rozwoju powikłań naczyniowych.

Celem podjętej dysertacji doktorskiej stało się określenie częstości występowania wczesnych zmian naczyniowych u pacjentów pediatrycznych z cukrzycą typu 1 oraz poszukiwanie związku pomiędzy stężeniem cytokin, chemokin i czynników wzrostu a nasileniem powikłań naczyniowych, w zależności od sposobu leczenia, w tym terapii z zastosowaniem limfocytów Tregs. Doktorantka podjęła również próbę odpowiedzi na pytanie, czy pacjenci, którzy otrzymali preparat Tregs, różnią się pod względem częstości występowania zmian naczyniowych oraz stężenia biomarkerów od pozostałych badanych grup. Badania miały na celu określenie, czy inne czynniki - takie jak wyrównanie metaboliczne choroby, czas trwania cukrzycy, dobowy dawka insuliny, stężenie c-peptydu przy rozpoznaniu choroby, zaburzenia lipidowe oraz stężenie witaminy D3 - mogły mieć wpływ na stężenie cytokin, chemokin i czynników wzrostu.

Lekarka Anna Wołoszyn-Durkiewicz sformułowała główną i dodatkową hipotezę badawczą i tak: doktorantka założyła, iż Pacjenci z T1D rozwijają wczesne zmiany naczyniowe już w dzieciństwie i wieku nastoletnim. Stężenie cytokin, chemokin oraz czynników wzrostu koreluje z nasileniem angiopatii. Możliwy jest również wpływ na stężenie biomarkerów innych czynników, takich jak wyrównanie metaboliczne, czas trwania choroby, dobowy dawka insuliny oraz stężenie witaminy D3. Ponadto dodatkowo sprawdzano hipotezę dodatkową, która zakłada, że pacjenci, którzy otrzymali terapię Tregs, rozwijają powikłania naczyniowe później, a stężenie cytokin,

chemokin i czynników wzrostu po otrzymaniu preparatu Tregs może ulec zmianie nawet kilka lat po zakończeniu terapii.

Następnie lekarz Anna Wołoszyn-Durkiewicz omawia badane grupy pacjentów, sposób ich doboru oraz zastosowane metody badawcze i statystyczne. Wyłonione przez doktorantkę grupy badane liczyły: 52 osoby z przewlekłą T1D ( $ls\text{-}T1D \geq 4$  lata choroby), 8 osób, które uczestniczyły w badaniu klinicznym TregVAC 2.0 (t-T1D), 12 pacjentów z T1D, którzy stanowili grupę kontrolną wobec pacjentów z grupy t-T1D (tc-T1D), oraz 39 zdrowych osób (HD). Autorka analizowała badane grupy również w dodatkowych podziałach, w zależności od stopnia wyrównania metabolicznego oraz czasu trwania choroby.

Stężenie cytokin, chemokin i czynników wzrostu zbadano przy użyciu zestawu Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel. U każdego pacjenta wykonane zostały badania krwi, 24-godzinna zbiórka moczu celem oceny albuminurii, optyczna koherentna tomografia dna oka (OCT) oraz pomiar grubości kompleksu błony środkowej-wewnętrznej (IMT) tętnic szyjnych w kierunku istnienia subklinicznych zmian miażdżycowych. Doktorantka analizowała również masę trzustki. W pracy zastosowano współczesne, nie budzące zastrzeżeń metody statystyczne, zgodnie z rozkładem analizowanych zmiennych, dostosowane do liczebności grup oraz wynikające z założeń pracy. Prezentacja wyników odpowiada zastosowanym testom i rozkładowi badanych zmiennych.

Następnie Autorka przedstawiła wyniki swojej pracy. Sposób prezentacji danych cechuje godna podziwu skrupulatność. Na pozytywne wyróżnienie zasługuje bardzo dobre przemyślenie podziału wyników na podrozdziały i jednakowy schemat opisu i analizy wyników w obrębie wszystkich badanych i wyróżnionych dodatkowo grup. Wyniki przedstawione zostały zatem bardzo czytelnie, co bywa sporym problemem w tego typu rozprawach. Doktorantka ilustruje wyniki wieloma tabelami i kolorowymi wykresami, które ułatwiają przyswojenie tak dużej dawki wiedzy. U bardzo niewielkiego odsetka pacjentów lekarz Anna Wołoszyn-Durkiewicz stwierdziła występowanie subklinicznych, bardzo wczesnych etapów powikłań naczyniowych. Stężenie cytokin, chemokin i czynników wzrostu w każdej z badanych grup było odmienne. Wykazała między innymi dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem badanych biomarkerów, a czasem trwania choroby, albuminurią, OCT i IMT, co wskazuje na ich istotną rolę w detekcji wczesnych zmian naczyniowych. Ponadto wykryła korelacje pomiędzy stężeniem biomarkerów a rozmiarem trzustki, wykazując, że proces destrukcyjny przez nie mediowany, nie dotyczy tylko komórek  $\beta$  trzustki. Pacjenci z grupy t-T1D wykazywali najlepsze wyrównanie metaboliczne oraz najwyższe stężenie witaminy D3 spośród pacjentów z cukrzycą typu 1. Prezentowali oni najniższe stężenie IL-17 i najwyższe stężenie MCP-1 ze wszystkich grup. Ponadto pacjenci po

terapii Tregs wykazywali dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem witaminy D3, a cytokinami anty-zapalnymi. Przy tak dużej liczbie analizowanych biomarkerów bardzo ciekawym pomysłem był pokazanie wyników w postaci „map ciepła” .

W ciekawej, 24 stronicowej, podzielonej na kilka tematycznych podrozdziałów, będących odzwierciedleniem podrozdziałów w części Wyniki, Dyskusji, Autorka odnosi uzyskane przez siebie kolejne wyniki do danych innych badaczy, rzeczowo tłumaczy uzyskane rezultaty. W dyskusji Doktorantka podkreśliła niską częstość powikłań naczyniowych nie tylko w wynikach swoich badań, ale w wielu aktualnie opublikowanych analizach, dotyczących młodych pacjentów współczesnych.

Z jednej strony cieszy niezmiernie niska częstość jawnych klinicznie, czy nawet subklinicznych powikłań angiopatycznych, a z drugiej strony diabetolodzy mają świadomość dużego ryzyka rozwoju tych powikłań w przyszłości i skróconego okresu przeżycia pacjentów z cukrzycą typu 1. Stąd niezmiernie ważna jest możliwość przewidywania i wykrywania tych powikłań za pomocą, między innymi zaproponowanych przez doktorantkę, cytokin, chemokin czy czynników wzrostu. Takie analizy pomagają również zrozumieć mechanizmy prowadzące do rozwoju jawnych klinicznie powikłań. Za niezwykle cenne i z pewnością warte długofalowej analizy na większej grupie pacjentów uważam badania w grupie dzieci poddanych terapii komórkami Tregs. Wyniki rozprawy doktorskiej lekarz Anny Wołoszyn-Durkiewicz po raz pierwszy podsumowują aspekt możliwych powikłań przewlekłych i ich zapobiegania po zastosowaniu tejże terapii. Dotychczas zwracaliśmy uwagę tylko na pierwsze efekty – utrzymania/ przedłużenia remisji, zmniejszonego zapotrzebowania na insulinę. Wyniki Doktorantki pozwalają spojrzeć na potencjalne korzyści z terapii jeszcze szerzej.

Rozprawę kończą wnioski, które wynikają z przeprowadzonych badań i stanowią klarowną odpowiedź na szczegółowe cele dysertacji. 1. Rola cytokin, chemokin i czynników wzrostu w rozwoju powikłań naczyniowych u pacjentów z T1D jest bardzo istotna, ale wciąż nie w pełni poznana. Niezbędne są dalsze badania w tym zakresie. 2. Mimo, że większość pacjentów z cukrzycą typu 1 nie prezentuje jawnych klinicznie objawów angiopatii w dzieciństwie, konieczne jest prowadzenie screeningu w populacji pediatrycznej. Wczesne wykrycie zmian naczyniowych pozwala na zahamowanie dalszej progresji choroby oraz zintensyfikowanie kontroli i insulinoterapii. 3. Czynniki takie jak czas trwania cukrzycy typu 1, wyrównanie metaboliczne choroby, całkowita dobową dawkę insuliny, stężenie lipidogramu, poziom witaminy D3 czy stężenie c-peptydu przy rozpoznaniu choroby, wydają się mieć wpływ na rozwój powikłań naczyniowych u pacjentów. 3. W analizie skomplikowanej sieci cytokin, chemokin i czynników wzrostu u pacjentów z T1D należy wziąć pod uwagę wpływ wcześniej stosowanych terapii oddziałujących na układ immunologiczny. 4. Podaż Tregs może zmienić stężenie biomarkerów u pacjentów z T1D. Grupa pacjentów, którzy byli leczeni

Tregs, jest unikatowa, a efekty terapii mogą się utrzymywać nawet wiele lat po jej zakończeniu. 5. Wymagana jest długoterminowa obserwacja pacjentów po terapii Tregs, by określić wpływ preparatu na zmniejszenie ryzyka rozwoju powikłań naczyniowych w przyszłości, nawet wiele lat po zakończeniu terapii. 6. Zaobserwowano znaczne zmniejszenie liczby przypadków powikłań naczyniowych w populacji pediatrycznej na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat. Większość pacjentów, nawet z grupy chorujących przewlekle (Is-T1D), wciąż nie wykazywała objawów mikroangiopatii i makroangiopatii cukrzycowej.

Z obowiązku recenzenta, zwracam uwagę doktorantki na pewne, drobne nieścisłości nieprawidłowości czy błędy. W celach pracy, moim zdaniem, nie należało pisać o określeniu częstości występowania wczesnych zmian naczyniowych. Badana grupa jest zbyt mała do tego typu wnioskowania. I podobnie ostatni wniosek, aczkolwiek absolutnie zgodny z rzeczywistością, mówiący o znacznym zmniejszeniu liczby przypadków powikłań naczyniowych na przestrzeni ostatnich lat – nie wynika z badań przeprowadzonych przez doktorantkę, tylko z analizy opisywanego piśmiennictwa. Czy w dodatkowej hipotezie badawczej doktorantka miała dokładnie na myśli, że u pacjentów którzy otrzymali terapię Tregs, stężenie analizowanych cząsteczek może ulec zmianie nawet kilka lat po zakończeniu terapii (tu należałoby porównać te stężenia bezpośrednio po terapii i kilka lat po), czy też raczej, że stężenie cząsteczek może ulec zmianie pod wpływem terapii i utrzymywać się zmienione kilka lat po zakończeniu terapii – to drugie sformułowanie wydaje mi się bardziej zgodne z recenzowanymi wynikami. Grupę pacjentów włączonych do badania nazywamy grupą badaną, grupą badawczą była doktorantka oraz zespół wspierających ją pracowników naukowych, biorących udział w projekcie. W opisie stosowanych metod, przy szczegółowym podziale badanych grup warto było uzasadnić punkt odcięcia hemoglobiny glikowanej na 8%, czy podział ze względu na czas trwania choroby 7 lat, powyżej i poniżej. Skąd akurat takie wartości? Zamieszczane ryciny wymagają dokładnej legendy również na grafice (np. rycina 14 – dopiero w opisie dowiadujemy się, że chodzi o Il-10, czy G-CSF). W tabeli 3 pomyłono liczbę badanych w grupach, można by wnioskować, że albuminuria występowała u większości – n=45. W tabeli nr 6 – zabrakło niektórych danych, a wartość HBA1c w grupie chorych na cukrzycę opisano jako 1%. Opis tabeli w tekście jest na szczęście prawidłowy. Przy przygotowywaniu pracy do druku proponowałabym również zmianę kolejności wniosków od tych bezpośrednio wynikających z uzyskanych wyników – czyli np. wnioski nr 3, drugi wniosek nr 3 (pomyłona numeracja?) oraz 4. Natomiast wnioski 1, 2, 5 – nakreślające rzeczywistą potrzebę dalszych badań w podjętym kierunku – powinny być ostatnie.

Mam nadzieję, że uwzględnienie poczynionych przeze mnie uwag w późniejszym czasie przygotowywania opracowanych wyników do publikacji w formie prac oryginalnych, co zapewne doktorantka zamierza poczynić, pomoże opublikować wyniki badań w renomowanych tematycznych

czasopismach. Jestem przekonana, że z rezultatami recenzowanego przeze mnie projektu naukowego powinno się zapoznać zdecydowanie szersze grono naukowych czytelników. Gorąco zachęcam do kontynuacji podjętego tematu.

Poczynione przez mnie uwagi krytyczne nie umniejszają wartości pracy, którą przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Zaprezentowana do oceny rozprawa doktorska wskazuje na duże doświadczenie doktorantki w pracy naukowo-badawczej. Tezy pracy zostały dobrze przemyślane, materiał jest rzetelnie i wnikliwie opracowany, a wysunięte wnioski świadczą o wysokich umiejętnościach logicznej i samodzielnej analizy. Pracę przeczytałam z ogromnym zainteresowaniem, pragnę potwierdzić wysoką jakość merytoryczną, kliniczną i naukową ocenianej przeze mnie pracy, co zapewne jest także wynikiem ogromnego doświadczenia Promotora pracy doktorskiej, Pani Prof. Małgorzaty Myśliwiec.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa lekarz **Anny Wołoszyn-Durkiewicz pt.: "Wybrane cytokiny w diagnostyce prognostycznej powikłań naczyniowych u pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy typu 1 oraz odniesienie stopnia nasilenia powikłań do sposobu leczenia"** spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz 882, z późn zm.). W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Kolegium Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wnioski o dopuszczenie lekarz **Anny Wołoszyn-Durkiewicz** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Barbara Głowińska-Olszewska

Białystok, 31.03.2022

