



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Kraków 12 marzec 2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Dudy pt.: „WYDALANIE GLIKOZOAMINOGLIKANÓW Z MOCZEM U OTYŁYCH CHORYCH NA CUKRZYCĘ TYPU 2 LECZONYCH INSULINĄ DETEMIR”

Praca wykonana przez mgr Małgorzatę Dudę

Promotorzy:

dr hab. n. farm. PAWEŁ OLCZYK - Zakład Farmacji Aptecznej Wydział Nauk Farmaceutycznych Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

dr hab. inż. prof. UŚ ROBERT KOPROWSKI - Instytut Inżynierii Biomedycznej, Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytet Śląski w Katowicach

Cukrzyca jest przewlekłą chorobą metaboliczną. Pomimo postępującego rozwoju opieki zdrowotnej ilość nowych zachorowań rośnie a liczba chorych na świecie osiągnęła pół miliarda osób. Wzrost liczby nowych przypadków cukrzycy i leczenie jej powikłań u pacjentów już na nią chorujących powoduje dodatkowe istotne obciążenie wydatków na ochronę zdrowia i budżetów wszystkich państw. Trzeba sobie zdawać sprawę, że realne koszty cukrzycy dla gospodarki są znacznie wyższe od danych prezentowanych przez oficjalne źródła. Tak więc podjęcie badań nad nowymi markerami przebiegu cukrzycy oraz skuteczności leczenia choroby uważam za w pełni zasadne zarówno pod względem naukowym jak i praktycznym.

W warstwie merytorycznej praca obejmuje problematykę cukrzycy, wybrane aspekty leczenia choroby (insulinoterapię), zagadnienia biochemii glikozoaminoglikanów oraz tematykę analizy wizualizacji i interpretacji stężeń glikozoaminoglikanów w moczu.

Trzy pierwsze nurty tematyczne zawarte są w obszernym wstępie.

Pierwsza część poświęcona jest etiopatogenezie cukrzycy, porusza problem lawinowego wzrostu zachorowań. Doktorantka szeroko opisuje także problematykę powikłań cukrzycy. Ta część pracy napisana jest klarownie, bogato ilustrowana może stanowić cenny materiał dydaktyczny dla studentów kierunków medycznych.

W dalszej części Doktorantka omawia szeroko diagnostykę cukrzycy oraz stosowane leki omawiając szczegółowo problematykę insulinoterapii. Jeden z podrozdziałów dotyczy właściwości insuliny detemir i jest bezpośrednio związany z celem pracy. Podobnie jak poprzednio fragment poświęcony diagnostyce napisany jest klarownie. Zawiera rys historyczny co czyni ten fragment pracy ciekawszym dla osób nie zajmujących się bezpośrednio problematyką leczenia różnych wariantów cukrzycy. Ten fragment dysertacji stanowi kolejny element pracy o dużej wartości dydaktycznej.

Kolejne kilkanaście stron wstępu poświęcone jest problematyce glikozoaminoglikanów. To bardzo specjalistyczny fragment pracy. Doktorantka szczegółowo opisuje klasyfikację i ogólną charakterystykę glikozoaminoglikanów, ich biosyntezę i katabolizm. Osobny podrozdział porusza mechanizm wydalania glikozoaminoglikanów z moczem. Doktorantka słusznie zauważa, że wyrazem modyfikacji biochemicznych, które obejmują glikozoaminoglikany tkankowe, w tym m.in. glikozoaminoglikany obecne w proteoglikanach błony podstawnej kłębuszków nerkowych, może być wielkość wydalania (glikozoaminoglikanów) z moczem. Moim zdaniem w tym miejscu brakuje informacji, że modyfikacja budowy glikozoaminoglikanów i proteoglikanów błony podstawnej kłębuszków nerkowych wpływa nie tylko na wydalanie glikozoaminoglikanów, ale także białek osocza w tym albuminy. Zmiany ilości wydalanej z moczem albuminy nawet w zakresie tzw. normoalbuminurii lub nieznacznie podwyższonej albuminurii są jednym z najwcześniejszych, powszechnie badanych, markerów rozwoju cukrzycy. W ten sposób oznaczanie glikozoaminoglikanów wydalanych z moczem uzyskałoby jeszcze mocniejszą argumentację. Tym bardziej, że w eksperymentalnej części pracy równoległe ze stężeniami różnych form glikozoaminoglikanów oznaczana jest albumina w niskim zakresie stężeń.

Fragment wstępu poświęcony budowie, właściwościom chemicznym i fizycznym glikozoaminoglikanów świadczy o głębokiej wiedzy Doktorantki. Proteoglikany stanowią heterogenną grupę glikoprotein i tworzą komponenty macierzy pozakomórkowej, występują również w obrębie komórek. Informacje dotyczące złożonej problematyki syntezy glikozoaminoglikanów, które są składnikami proteoglikanów stanowiących grupę glikoprotein ścian naczyń krwionośnych, płuc, skóry, błony śluzowej jelit, wątroby, nerek i tkanki nerwowej dobrze ilustruje złożoność problemu jaki został podjęty w pracy. Doktorantka omówiła skomplikowaną problematykę katabolizmu i nie w pełni wyjaśniony mechanizm wydalania glikozoaminoglikanów z moczem. Zwróciła uwagę, że wydalanie glikozoaminoglikanów zawartych we krwi, będących zarówno pochodzenia tkankowego, jako produktów zachodzącej

– *in situ*, poza łożyskiem naczyniowym, degradacji proteoglikanów, czy produktów tkankowej depolimeryzacji wielkocząsteczkowych glikoaminoglikanów odbywa się na drodze filtracji kłębuszkowej.

Szeroko rozbudowany wstęp stanowi solidną bazę do sprecyzowania celu pracy.

Cel pracy składa się z szerokiego uzasadnienia ogólnego i precyzyjnego określenia zadań szczegółowych. Należy podkreślić, że ogólny cel pracy jest w pełni zasadny. Cukrzyca jako choroba jest jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. W warstwie eksperymentalnej doktorantka podjęła się oznaczania wydalanych z moczem glikoaminoglikanów w trakcie leczenia choroby. W skład pracy wchodzi więc oznaczenia biochemiczne spoza rutynowego panelu badań diagnostycznych, wymagające opanowania złożonego warsztatu badawczego. Przekłada się to na wysoki poziom naukowy pracy. Osobnym celem pracy była próba stworzenia automatycznej i powtarzalnej metody analizy powiązań (korelacji) i wizualizacji wybranych parametrów opisujących stan pacjentów.

Rozdział materiały i metody zawiera charakterystykę kliniczną i wybrane parametry biochemiczne krwi pacjentów otyłych, chorych na cukrzycę typu 2, przed i po leczeniu insuliną detemir. Analogiczne dane przedstawiono dla grupy kontrolnej.

Szczegółowo opisano także procedury oznaczania wybranych parametrów biochemicznych np. albuminy w moczu. Doktorantka zdecydowała się na podawanie wskaźnika albumina/kreatynina w $\mu\text{g}/\text{mg}$. Osobiście uważam, że nie jest to trafny wybór gdyż formalny zabieg zmiany jednostek na mg/g byłby bezpośrednią miarą wydalania dobowego albuminy. Zresztą tak właśnie prezentowane są wartości indeksu w rozdziale wyniki.

Wyczerpująco przedstawiono procedurę ilościowego oznaczania siarczanowanych glikoaminoglikanów w mocz oraz stężenia kwasu hialuronowego w moczu. Jestem zwolennikiem podawania szczegółowych opisów nierutynowych oznaczeń biochemicznych. Opisy takie są cenną pomocą dla wszystkich, którzy chcieliby powtórzyć lub rozszerzyć podobne badania. W rozdziale materiały i metody podano także metodykę analizy statystycznej i bioinformatycznej. Ta ostatnia stanowi autorski algorytm pozwalający na automatyczne i powtarzalne wykonywanie analiz. Zawiera szczegółowy opis stosowanych algorytmów i makr w programie MS Excel oraz programie Matlab wykorzystaniem nakładki Image Processing Toolbox.

Rozdział wyniki jest bardzo obszerny i zawiera charakterystykę numeryczną wybranych parametrów dla osób z grupy badanej, chorych na cukrzycę przed leczeniem i chorych na cukrzycę po leczeniu insuliną detemir. Zestawiono także cały panel korelacji wybranych parametrów. Przy albuminie w grupie osób chorych na cukrzycę przed leczeniem i poddanych 6 – miesięcznej terapii u większości pacjentów stosunek albuminy do kreatyniny wskazywał na prawidłową albuminurię lub nieznacznie zwiększoną albuminurię (mediana 9,7; 9,8 trzeci kwartył 23, 83; 20,05).

Podobnie mało zróżnicowane są wyniki odsetka (a nie jak to przedstawiono na ryc. 24 stężenia) hemoglobiny glikowanej.

W podrozdziale czwartym zawarto analizę bioinformatyczną wyników. Zawiera ona liczne wykresy zmian poszczególnych wartości badanych cech. Szczególnie ciekawe wydają mi się wykresy 54-56 pozwalające na intuicyjną ocenę korelacji wielu parametrów równocześnie.

W dyskusji Doktorantka uzasadnia tezę, że glikozoaminoglikany „wpisują się” w profil użytecznego biomarkera zaburzeń węglowodanowych w przebiegu cukrzycy typu 2. Zwraca uwagę na fakt, iż zmiany strukturalne w błonie podstawnej kłębuszków nerkowych mogą wystąpić jeszcze przed wystąpieniem mikroalbuminurii, a wczesne określenie wzrastającego stężenia GAGs w moczu może przyczynić się do szybszej diagnozy tych zaburzeń. Niestety Doktorantka nie wykazała jednak w przeprowadzonych przez siebie badaniach zwiększonego wydalania GAGs całkowitych z moczem u chorych na cukrzycę typu 2. Doktorantka krytycznie zestawiała wyniki prowadzonych przez siebie badań z rezultatami prac innych autorów. Uważam, że jedną z przyczyn rozbieżności jest fakt, że w grupie pacjentów badanych w recenzowanej pracy nie było przypadków zaawansowanego zespołu nerczycowego lub wyraźnej mikroalbuminurii. W grupie osób chorych na cukrzycę przed leczeniem i poddanych 6 – miesięcznej terapii u większości pacjentów stosunek albuminy do kreatyniny wskazywał na prawidłową albuminurię lub nieznacznie zwiększoną albuminurię (mediana odpowiednio 9,7; 9,8 trzeci kwartył 23, 83; 20,05). Podobnie mało zróżnicowane są wyniki odsetka hemoglobiny glikowanej.

Przeprowadzona dyskusja wyników jest obszerna krytyczna i świadczy o wysokiej wiedzy Doktorantki.

Uwagi formalne

Jak w każdej obszernej pracy recenzentowi oddało się znaleźć kilka uchybień redakcyjnych. I tak:

Na rycinach 12 i 13 przedstawiono wzór strukturalny jednostki siarczanu chondroityny oraz jednostki siarczanu dermatanu. Jednak na rycinach brakuje samych reszt siarczanowych. Zaznaczone są tylko alternatywne miejsca podstawienia. Tę informację można było zawrzeć w poszerzonych opisach rycin. Podobne zastrzeżenia można mieć do ryciny 14 i 15 przedstawiającej jednostki siarczanu heparanu/heparyny i keratanu.

Na ryc. 24 przedstawiono wartości stężenia hemoglobiny zamiast wyników odsetka hemoglobiny glikowanej.

Doktorantka nadużywa zwrotu „Ocena stężenia..” podczas gdy w istocie dotyczy on oznaczania stężenia.

W rozdziale wyniki niektóre informacje są niepotrzebnie powtórzone np. metodyka oznaczania glukozy czy insuliny.

Na rycinie 46 brak opisu jednostek na osiach - w kodzie do ryciny 46 wystarczyło zamienić polecenie zlabel('albumina'); poleceniem zlabel('albumina mg/l').

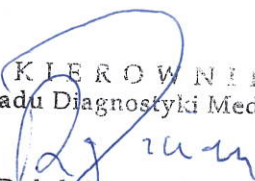
Wszystkie te uwagi podaję z obowiązku recenzenta i w żaden sposób nie wpływają na wysoki poziom merytoryczny pracy.

Podsumowując, dysertacja doktorska mgr Małgorzaty Dudy pt.: „WYDALANIE GLIKOZOAMINOGLIKANÓW Z MOCZEM U OTYŁYCH CHORYCH NA CUKRZYCĘ TYPU 2 LECZONYCH INSULINĄ DETEMIR” porusza ważną z medycznego i społecznego punktu widzenia problematykę diagnozowania monitorowania i leczenia cukrzycy. Autorka posłużyła się właściwą, oryginalną metodyką i wykonała samodzielnie szerokie spektrum uzasadnionych merytorycznie analiz. Otrzymane wyniki zostały przedstawione w nowatorskiej formie bioinformatycznej potencjalnie sprzyjającej dalszej analizie z zastosowaniem systemów tzw. sztucznej inteligencji. Otrzymane wyniki zostały szczegółowo przedyskutowane w świetle najnowszego, właściwie dobranego piśmiennictwa, którego nie mała część pochodzi z ostatnich pięciu lat. Praca posiada typową, dobrze zrównoważoną strukturę.

Praca spełnia wymagania 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. z 2003 r. Nr 65, poz. 595;

z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455, z 2014 r. poz. 1198.).

Z pełnym zatem przekonaniem przedkładam Przewodniczącemu Rady Dyscyplin Medycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wniosek o dopuszczenie mgr Elżbiety Małgorzaty Dudy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Diagnostyki Medycznej

Dr hab. Ryszard Drożdż