

Ocena

rozprawy doktorskiej lekarz Beaty Polowczyk-Kawałko

pt. Ocena stężenia rozpuszczalnego delta-podobnego homologu typu 1 (sDlk-1) u pacjentów z akromegalią

Rozprawa doktorska przedłożona przez lekarz Beatę Polowczyk-Kawałko pochodzi z Katedry i Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, placówki znanej i cenionej nie tylko z powodu wysokiego profesjonalizmu w zakresie leczenia chorób gruczołów dokrewnych, ale również z powodu prowadzenia wartościowych badań z dziedziny neuroendokrynologii.

Założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej było dociekanie czy delta-podobny homolog typu 1 (Dlk-1) ma znaczenie w patomechanizmie akromegalii i współistniejących z nią zaburzeń metabolicznych. Dlk-1 uważany jest za ważny represor różnicowania preadipocytów. Obie jego formy, zarówno transbłonowa jak i rozpuszczalna, współdziałają hamując różnicowanie komórek macierzystych tkanki tłuszczowej, co czyni Dlk-1 głównym regulatorem homeostazy preadipocytów i ich ekspansji. Lepsze zrozumienie komórkowych i molekularnych podstaw wzrostu tkanki tłuszczowej w stanach fizjologicznych i patofizjologicznych, może zapewnić środki do opracowania strategii terapeutycznych w zapobieganiu i leczeniu otyłości. Niewykluczone zatem, że podjęte przez Doktorantkę badania i uzyskane wyniki znajdą w przyszłości zastosowanie praktyczne. Autorka zajmuje się jednym z prawdopodobnych sposobów personalizowania terapii akromegalii i zaburzeń metabolicznych, co, takie są nasze oczekiwania, ma charakteryzować się jej większą skutecznością i mniejszą ilością objawów niepożądanych. Niniejszy temat badań wpisuje się w aktualny w tej dekadzie trend badawczy, a opracowanie i zrealizowanie przez Doktorantkę zadania badawczego opisanego w dysertacji wskazuje na Jej sprecyzowane zainteresowania i potwierdza posiadane umiejętności naukowe i kliniczne.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 78 stron i została podzielona na klasyczne rozdziały stosowane w tego typu opracowaniach.

Rozpoczyna ją strona tytułowa. Tytuł w jasny sposób oddaje ogólny cel jaki postawiła sobie Autorka dysertacji.

Po stronie tytułowej następują piękne w treści podziękowania dla Promotora - Profesora Marka Bolanowskiego, Współpracowników i Bliskich Doktorantce osób.

Wykaz skrótów użytych w pracy zajmuje 2 strony. Wykaz ten jest przejrzysty, a zastosowane skróty są właściwe i nieprzypadkowe, co ułatwia czytanie rozprawy. Wyjaśnienia skrótów podano w języku polskim i angielskim. W dużej części zawarte w Wykazie skróty powstały z pełnej nazwy w języku angielskim.

Wykaz tabel i rycin zajmuje 1 stronę.

Spis treści (2 strony) jest czytelny i stanowi odzwierciedlenie podziału rozprawy na rozdziały.

Wstęp (18 stron) rozpoczyna ogólny opis akromegalii. W części szczegółowej wpiętej omówiono fizjologiczne działanie hormonu wzrostu (GH) na tkanki, a potem zaburzenia narządowe i metaboliczne rozwijające się w akromegalii. Tekst z tej części dysertacji może być dobrym materiałem do podręcznika – trudne zagadnienia przedstawiane są w sposób przejrzysty. Czytałem tę część Wstępu z przyjemnością. Zainteresował mnie szczególnie fragment o charakterystycznej dla akromegalii redystrybucji tkanki tłuszczowej, i patomechanizmie tego zjawiska. Niektóre badania wykazały, że pacjenci z czynną akromegalią mają niższy odsetek trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej i większą ilość tkanki tłuszczowej między włóknami mięśniowymi. Rozdział o delta-podobnym homology typu 1 (Dlk-1) oraz rozpuszczalnej formie delta-podobnego homology typu 1 (sDlk-1) jest zasadniczą częścią Wstępu, która prowadzi do Założeń rozprawy i zawiera szereg ciekawych obserwacji oraz dowodów naukowych. Autorka podaje, że Dlk-1 jest czynnikiem utrzymującym komórki zdolne do proliferacji w formie niezróżnicowanej, co może budzić skojarzenia z podtrzymywaniem właściwości komórek macierzystych – to intrygujące. U ludzi ekspresja Dlk-1 jest największa w okresie embrionalnym, maleje w trakcie rozwoju płodowego, po narodzeniu zaś ogranicza się jedynie do wybranych tkanek o charakterze endokrynnym. Za przykład może tu posłużyć przysadka. W życiu płodowym Dlk-1 występuje we wszystkich jej komórkach neuronalnych i gruczołowych, ale wraz z rozwojem tkanek Dlk-1 systematycznie zanika. W obrębie dojrzalej przysadki, w warunkach fizjologicznych, ekspresja Dlk-1 jest ograniczona jedynie do komórek somatotropowych obszaru aparatu Golgiego. Wspólne występowanie GH i Dlk-1 w obrębie komórek przedniego płata przysadki, choć dotyczy różnych przedziałów wewnątrzkomórkowych, rodzi pytanie o ich współzależności w aspekcie ich sekrecji i efektów działania. Dlk-1 jest wysoce aktywny w guzach somatotropowych przysadki, zidentyfikowano go też w niektórych guzach prolaktynowych. Pozostałe nowotwory przedniego płata nie wykazują aktywności tego białka. Czytając Wstęp zastanawiałem się czy stężenie sDlk-1 we krwi koreluje z ekspresją Dlk-1 w tkankach, a jeśli tak to w jakich sytuacjach. Jakie czynniki i sytuacje wpływają, czy też modyfikują, odłączanie domeny zewnątrzkomórkowej Dlk-1, która jak wynika z tekstu utworzy sDlk-1. Autorka jednym celnym zdaniem skomentowała ten fakt w ostatnim podrozdziale Dyskusji o jej ograniczeniach. Komentarz do Wstępu: Na str. 11. dodałbym, że IGFBP-3 jest jednym z 6 (może 7) białek wiążących IGF-1. Na str. 13 zastanawiałem się, czy do powikłań metabolicznych prezentowanych przez Autorkę powinno zaliczać się hipogonadyzm i hipertyreozę. Są to powikłania narządowe, choć owszem, ich patomechanizm dotyka również aspektu metabolicznego. Niewykluczone, że o to chodziło w cytowanej pracy [23]? Na str. 15 – z Ryciny 3 wyłączono powikłania sercowo-naczyniowe choć jest

zatytułowana „Powikłania narządowe w akromegalii”, może to w przyszłości wprowadzić w błąd czytelnika. Na str. 15 – Czy gruczolaki wydzielające GH wykazują ekspresję dwóch typów receptorów dla somatostatyny? Czy opisywano *somatotropinoma* z ekspresją SSTR1, SSTR3 i SSTR4? Czy dalszy fragment tekstu o pazyreotydzie pośrednio nie podaje informacji o takiej sytuacji w odniesieniu do SSTR1 i SSTR3? Na str. 21 – Co oznacza określenie „czynnik błonowy”? Na str. 23 – Czy w określeniu „ektodomena” chodzi o zewnątrz błonowy fragment Dlk-1, czyli w istocie o sDlk-1? Czy to określenie jest tu właściwe? Na str. 24 zamiast „ekspresja sDlk-1” powinno być „stężenie sDlk-1” np. we krwi. Zadając powyższe pytania wskazuję na miejsca, które proponuję przemyśleć przy przygotowywaniu manuskryptów przyszłych publikacji. Podsumowując, Wstęp zawiera niezbędne do realizacji celów pracy wprowadzenie i odpowiednie definicje. Wywody i przemyślenia Autorki prezentowane w tym rozdziale są ułożone logicznie i konsekwentnie prowadzą do założeń i celu pracy.

Założenia i cele pracy (1 strona), prowadzą do sformułowania zasadniczego celu rozprawy, a jest nim analiza stężenia rozpuszczalnej formy sDlk-1 u pacjentów z akromegalią będących na różnych etapach choroby i jej leczenia. Analizowano też związek sDlk-1 ze wskaźnikami gospodarki węglowodanowej i lipidowej. Celami szczegółowymi były: 1. Ocena stężenia sDlk-1 w krążeniu obwodowym osób chorujących na akromegalię w porównaniu do osób w grupie kontrolnej. 2. Ocena stężenia sDlk-1 na różnych etapach akromegalii. 3. Analiza potencjalnego związku stężenia sDlk-1 z gospodarką węglowodanową i lipidową w akromegalii. 4. Analiza zależności stężenia sDlk-1 z wykładnikami zawartości tkanki tłuszczowej oraz beztłuszczowej masy ciała ocenianych metodą DXA. 5. Ocena wpływu stosowania analogów somatostatyny na stężenie sDlk-1 w krążeniu osób z akromegalią. Komentarz do tego rozdziału: W niektórych miejscach rozprawy, a w celu głównym i celach szczegółowych, a także we wnioskach właściwe byłoby podanie materiału biologicznego w jakim oznaczano stężenie sDlk-1 np. we krwi obwodowej, surowicy krwi. W Założenia i celach pracy powinno też być: „... analiza stężenia rozpuszczalnej formy Dlk-1 (sDlk-1) ...” zamiast „... analiza stężenia rozpuszczalnej formy sDlk-1 ...”, „... stężenie sDlk-1 we krwi obwodowej ...” zamiast „... stężenie sDlk-1 w krążeniu ...”. Ponadto wydaje mi się, że stwierdzenie „Ustalenie związku pomiędzy sDlk-1 a GH jest kluczem do lepszego zrozumienia ...” jest chyba trochę przesadzone choć z drugiej strony wskazywać może na pasję z jaką Autorka podchodzi do swych badań.

Rozdział Materiał i metody (8 stron) ma typowy układ, zawarto w nim pięć tabel i dwie rycyny. Podziwiałem liczebność grupy badanej obejmującej pacjentów z akromegalią. Wydaje mi się, że dobrze byłoby podać kryteria włączenia osób do grupy kontrolnej. Czy grupę kontrolną utworzono po zrekrutowaniu pacjentów do grupy badanej? Opisanie sposobu rekrutowania do grupy kontrolnej pozwoliłoby na zrozumienie czy zamierzeniem Autorki było utworzenie grupy kontrolnej o podobnym profilu zachorowania na schorzenia współistniejące jak w grupie badanej, czy też kierowały Nią i inne zamierzenia. Autorka podaje N dla grupy badanej zarówno w tekście jak i w tabelach (bezpośrednio lub w ich tytułach), zarówno Rozdziale Materiał i metody, jak i w rozdziale Wyniki. Podaje również N dla podgrup AA, AK, AW, AS. W obu tych rozdziałach nie znalazłem jednak informacji o tym jak liczebne były kolejne podgrupy grupy badanej i kontrolnej - z cukrzycą (Tabela 9, Rycina 6), w stanie przedcukrzycowym (Tabela 10), z insulinoopornością (Tabela 11),

hipercholesterolemią (Tabela 12, Rycina 7), dyslipidemią aterogenną (Tabela 13), nadwagą (Tabela 14), otyłością (Tabela 15, Rycina 8). Ponadto na Str. 34 powinno być „procentowa zawartość tkanki tłuszczowej (%FAT)” oraz „stężenie sDlk-1” zamiast „stężenie Dlk-1”. W przyszłości Autorka powinna zwracać na to ostatnie uwagę gdyż w rozprawie są i inne miejsca w których nieprecyzyjnie zastosowano te skróty. We krwi oznaczano sDlk-1 gdyż Dlk-1 jest formą obecną w tkankach (wskazywanie tu na ekspresję jest właściwe). Metody statystyczne zostały dobrane właściwie.

Rozdział Wyniki (12 stron) zawiera 12 tabel i 6 rycin, które wpleciono w tekst opisujący w części ich zawartość. Ta część pracy jest logiczna, zrozumiała, a wcześniej dobrze zostały udokumentowane jej podstawy. Przy przygotowywaniu manuskryptów przyszłych publikacji proponuję w tabelach: ujednolicić ich styl, wprowadzić wspomniane powyżej N, usunąć „stężenia białka” z Tabeli 7, wprowadzić (pg/ml) do Tabeli 8, zamienić „Średnia (grupa badana) \pm SD” na np. „Grupa badana; średnia \pm SD” i w podobny sposób w miejscach z grupą kontrolną. Ryciny 9, 10, 11 w obecnej formie są „surowymi” rycinami z etapów analizy statystycznej, powinny być poddane edycji, w tym zamianie roboczych PREF-1 na sDlk-1.

Dyskusja obejmuje 13 stron. Dyskusja dowodzi rzetelnej wiedzy Doktorantki dotyczącej poruszanych zagadnień, umiejętności wykorzystania aktualnych danych z piśmiennictwa jak również umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za wnioskami. Podsumowując Dyskusję Autorka stwierdza, że model „otyłości” w akromegalii różni się od wzorca populacyjnego, a Jej obserwacje sugerują, że Dlk-1 nie pełni wyłącznie funkcji inhibitora adipogenezy. Powinien być traktowany jako czynnik posiadający związek z otyłością i wpływający na parametry gospodarki węglowodanowej. Komentarz do tej części rozprawy: Za niepotrzebne uważam zdanie na str. 48 „Uzyskane wyniki potwierdzają prawidłową kwalifikację pacjentów do wybranych grup.” w odniesieniu do stężeń GH i IGF-1 u pacjentów z akromegalią. Ze zdania na str. 52 „Potrzebne są dalsze prace w celu ustalenia roli sDlk-1 jako ...” oraz kolejnego na str. 56 „Jednak należy podkreślić, że do wysunięcia przekonujących wniosków wskazana jest kontynuacja badań w tej kwestii z uwzględnieniem modeli dynamicznych, o czym wspomniano wyżej.” może warto zrezygnować w przyszłych manuskryptach. Niemało czasopism, już w wytycznych dla autorów, zaleca unikanie tego typu sformułowań. Ponadto, czy znane jest inne niż enzymatyczne uwalnianie domeny zewnątrzkomórkowej Dlk-1 (str. 49)? Na str. 54 napisano „... może nam umożliwić przewidywanie efektów terapii analogami somatostatyny lub/i agonistą receptora hormonu wzrostu ...”. Dobry jest, kończący Dyskusję podrozdział o ograniczeniach badania.

Proponowane wnioski w liczbie 6 znajdują oparcie w całości wywodów Doktorantki:

1. Stężenie sDlk-1 w surowicy nie może służyć za marker diagnostyczny obecności ani aktualnej aktywności *somatotropinoma*.
2. Stężenie sDlk-1 w akromegalii nie zależy bezpośrednio od nasilenia sekrecji GH ani stężenia IGF-1 i nie ma związku z aktywnością choroby.
3. Analogi somatostatyny nie wpływają bezpośrednio na stężenie sDlk-1 w terapii przewlekłej, mimo uzyskania remisji choroby.
4. Obniżone stężenie sDlk-1 u pacjentów z akromegalią i rozpoznaną cukrzycą może być markerem potwierdzającym zaburzenia w obrębie komórek β trzustki.
5. Nie ma bezpośredniej korelacji pomiędzy stężeniem sDlk-1 a gospodarką lipidową w akromegalii. sDlk-1 nie jest markerem dyslipidemii aterogennej w tej

chorobie i nie może służyć za marker ryzyka sercowo-naczyniowego. 6. Istnieje związek sDlk-1 z ekspansją tkanki tłuszczowej u pacjentów z akromegalią i w populacji ogólnej. Wnioski korespondują z Celami pracy, co ułatwiło mi określenie w jakim stopniu Autorka zrealizowała postawione przed sobą zadania. Czytając wniosek 3 zastanawiałem się co Autorka rozumie przez remisję choroby.

Rozprawa zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 strony). Streszczenie sprawia wrażenie jakby Autorce nie starczyło już sił na jego opracowanie. W przyszłości Streszczenie będzie przez wielu czytelników czytane w pierwszej kolejności. To nie sDlk-1 występuje w dwóch izoformach a Dlk-1. Nie oznaczano tu stężenia Dlk-1 a sDlk-1. W metodologii nie wspomniano o grupie kontrolnej. W opisie wyników podano, że badano korelacje pomiędzy stężeniem sDlk-1 na różnych etapach aktywności choroby, a powinno być raczej różnice.

Piśmiennictwo, w większości anglojęzyczne, nie pomijające jednak istotnych doniesień polskich składa się z 109 pozycji ułożonych według kolejności cytowania. Dobór piśmiennictwa jest w podjętym temacie kompletny. Warto odnotowania są artykuły z Ośrodka Doktorantki i Jej Promotora.

Przechodząc do zbiorczej oceny rozprawy doktorskiej przedłożonej przez lekarz Beatę Polowczyk-Kawałko stwierdzić trzeba, że dysertacja ta dotyczy zagadnienia bardzo ciekawego. Zaslugą Doktorantki jest dokonanie badań rozszerzających nasz pogląd na patofizjologię delta-podobnego homologu typu 1, w szczególności w akromegalii. Oceniana rozprawa wskazuje na również na bardzo dobrą ogólną wiedzę Autorki w zakresie endokrynologii i chorób metabolicznych, a także dowodzi umiejętności prowadzenia pracy badawczej w tym zakresie. Zebrany materiał jest wystarczający dla należytego udokumentowania w metodyka postępowania badawczego jest dobrana właściwie i dobrze opisana. Błędy literowe i edycyjne trudne są do uniknięcia w tak dużych opracowaniach. Powyższe spostrzeżenia raczej niż uwagi Recenzenta w żadnym wypadku nie podważają znaczenia uzyskanych wyników. Zadając powyższe pytania wskazywałem jedynie na miejsca, które proponuję przemyśleć przy przygotowywaniu manuskryptów przyszłych publikacji. Autorka poradzi sobie z tym świetnie gdyż cechuje umiejętność właściwego postawienia aktualnego problemu badawczego oraz poprawnego jego rozwiązania w granicach określonych celem badań. Stwierdzam, że oceniana rozprawa nosi cechy samodzielnego dorobku naukowo-badawczego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668).

Zgłaszam przeto do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie lekarz Beaty Polowczyk-Kawałko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

