

WYDZIAŁ LEKARSKI W ZABRZU Z ODDZIAŁEM LEKARSKO-DENTYSTYCZNYM,
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH

Katedra i Klinika Pediatrii

ul. 3 Maja 13/15, 41- 800 Zabrze, sekretariat - tel.(032) 3704 283 (fax. 292)

e-pocztą: pedzab@sum.edu.pl

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziara

Recenzent: Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska

Zabrze, 27.07.2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Karoliny Nocuń-Wasilewskiej

”Ocena stanu śródbłonna naczyń krwionośnych u dzieci z cukrzycą typu 1”

Zgodnie z uchwałą Nr 530/VI/2018 Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu przedstawioną w piśmie z dnia 13.06.2018 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. redakcji przedłożonej pracy
4. znaczenia klinicznego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

1. Wartość celu badawczego

Mimo znacznego postępu nauk medycznych rozpoznanie cukrzycy jako choroby cywilizacyjnej - „epidemii XXI wieku” - w większości przypadków stawiane jest dopiero na etapie ciężkiego zaawansowania choroby, gdy obecne są jej późne powikłania, dotyczące wszystkich tkanek i narządów organizmu. Występowanie powikłań zwiększa znacząco chorobowość i śmiertelność w przebiegu cukrzycy, zarówno typu 1 jak i typu 2 oraz istotnie obniża jakość życia, stając się nierzadko przyczyną kalectwa. Cukrzyca jest główną przyczyną utraty wzroku, udarów, choroby niedokrwiennej serca, nasilenia miażdżycy, przewlekłej choroby nerek, polineuropatii nierzadko z zespołem stopy cukrzycowej, a także amputacji kończyn dolnych. Wobec powyższego istnieje konieczność poszukiwania nowych markerów, których sama

obecność bądź zmiany stężenia wskazywałyby na konieczność podjęcia odpowiednich działań profilaktycznych, by zahamować lub zwolnić postęp choroby.

We wstępie poza definicją i etiopatogenezą cukrzycy Doktorantka w sposób dokładny opisała historię naturalną choroby, scharakteryzowała 11 szlaków metabolicznych biorących udział w powstawaniu hiperglikemii. Wskazała, że przewlekła hiperglikemia wywiera niekorzystny wpływ na metabolizm komórek, przede wszystkim komórek śródbłonna naczyń krwionośnych bezpośrednio narażonych na długotrwały kontakt z glukozą w wyniku czego dochodzi do dysfunkcji endotelium, co zapoczątkowuje rozwój mikro-i makroangiopatii. Aktywowany śródbłonek uruchamia lawinę niekorzystnych procesów z nasileniem interakcji między komórkami układu białokrwinkowego i płytek krwi, pobudzeniem miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej oraz wzrostem pogotowia prozakrzepowego. Z uznaniem należy więc odnotować, że **lek. Karolina Nocuń-Wasilewska** podjęła się opracowania, ważnego z klinicznego punktu widzenia, zagadnienia jakim jest ocena dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u dzieci z cukrzycą.

W dalszej części wstępu **lek. Karolina Nocuń-Wasilewska** przedstawiła zagadnienia dotyczące cukrzycowej choroby nerek (CChN) [kryteria rozpoznania, szacowanie przesączania kłębuszkowego (eGFR) – normy, wzory do obliczeń, znaczenie albuminurii]. Kolejny fragment wstępu poświęcony został funkcji śródbłonna, rodzajom markerów umożliwiających ocenę stanu śródbłonna w aspekcie wazomotorycznym, immunologicznym i procesów krzepnięcia/fibrynolizy, a także fizycznych oraz mechanizmom cukrzycowej dysfunkcji śródbłonna włączając teorie: poliolową, stresu oksydacyjnego, glikacji białek, heksozoaminową. Doktorantka scharakteryzowała też szczegółowo wybrane markery dysfunkcji endotelium naczyniowego oraz opisała metodę badania autofluorescencji skórnej.

Z tego i dalszych fragmentów Rozprawy wynika niezbicie, że Doktorantka jest bardzo dobrze zaznajomiona z przedmiotem wykonywanych badań, zna i rozumie istotę zaburzeń.

Lek. Karolina Nocuń-Wasilewska za cel swoich badań wyznaczyła ocenę stanu śródbłonna naczyń krwionośnych u dzieci w przebiegu cukrzycy typu 1 za pomocą wybranych markerów uszkodzenia śródbłonna oznaczanych w surowicy oraz pomiarów autofluorescencji skórnej.

Doktorantka podała szczegółowe cele pracy w 4 podpunktach, które są sformułowane jasno i objęły następujące zagadnienia:

1. ocenę markerów uszkodzenia śródbłonna takich jak: międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (sICAM-1), naczyniowa cząsteczka adhezyjna (sVCAM-1), selektyna E (sE-SELEKTYNA), asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), inhibitor aktywatora

plazminogenu 1 (PAI-1), receptory dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE) oraz ocenę autofluorescencji skórnej (SAF)

2. określenie wpływu wybranych czynników na skalę uszkodzenia śródbłonka naczyń. Analizowano również czas trwania cukrzycy, stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy, wiek i płeć pacjentów, stan odżywienia pacjenta (ocena BMI), wartość przesączania kłębuszkowego (eGFR).

3. ocenę wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniem rozpuszczalnych w surowicy markerów uszkodzenia śródbłonka jak również pomiędzy tymi markerami a wynikami badań autofluorescencji końcowych produktów glikacji białek.

4. oszacowanie ryzyka wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych, w tym nefropatii cukrzycowej.

Należy szczególnie podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania są pierwszymi, wykonanymi w takim zakresie w dziedzinie diabetologii dziecięcej w Polsce.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Doktorantka objęła badaniami 66 dzieci (36 chłopców i 30 dziewczynek) z rozpoznaniem cukrzycy typu 1, leczonych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w wieku od 5 do 18 lat (średnio $12,7 \pm 3,6$ lat). Czas trwania choroby wahał się od 0 do 14 lat (średnia $3,8 \pm 4,2$ lat). U dzieci wykluczono obecność innych chorób przewlekłych i zapalnych. Pacjentów podzielono na 3 podgrupy w zależności od czasu trwania cukrzycy (0, 1-5, > 5 lat). Odnosząc się do siatek centylowych BMI, pacjentów zakwalifikowano do 4 grup: z niedowagą, prawidłowym odżywieniem, z nadwagą i otyłych. Do grupy kontrolnej włączono 21 zdrowych dzieci (5 chłopców i 16 dziewczynek) w wieku od 5 do 16 lat (średnia $9,3 \pm 2,9$ lat). Wszystkie badane markery stanu zapalnego śródbłonka oznaczono, wykorzystując test immunoenzymatyczny, tzw. „sandwich” ELISA. Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniano na podstawie stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Wartość eGFR wyliczano ze wzoru Schwartza w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy, natomiast wydalanie albumin z moczem oceniono na podstawie dobowej zbiórki moczu. Ocenę akumulacji końcowych produktów zaawansowanej glikacji w skórze wykonano z zastosowaniem pomiaru autofluorescencji skórnej (SAF) przy pomocy urządzenia AGE-Reader (DiagnOptics Technologies BV, Holandia).

Przeprowadzono adekwatną analizę statystyczną. W przypadku oceny stopnia nasilenia zmian zapalnych w śródbłonku naczyń zastosowano metodę Krefft.

2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób szczegółowy. Uzyskane dane i porównania wybranych parametrów udokumentowano w 17 dobrze dopracowanych graficznie tabelach oraz 11 rycinach (7 rycin złożonych).

Doktorantka w swojej Rozprawie wykazała, że:

1. U dzieci z cukrzycą stwierdza się podwyższone stężenie wszystkich ocenianych markerów (sVCAM-1, sICAM-1, sE-SELEKTYNA, PAI-1, ADMA, RAGE) w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy wartości wskaźnika autofluorescencji były podobne;
2. wyraźny wzrost stężeń w/w markerów obserwowano już w momencie rozpoznania choroby, podczas gdy wskaźnik stanu zapalnego w organizmie (CRP) był w zakresie normy. Im dłużej trwała choroba, tym stężenia wskaźników uszkodzenia śródbłonna przyjmowały wyższe wartości a nasilenie stanu zapalnego śródbłonna naczyń było największe. Stężenie białka C-reaktywnego było znacząco wyższe u pacjentów chorujących na cukrzycę co najmniej rok w porównaniu do dzieci zdrowych;
3. pacjenci z podwyższonym stężeniem białka C-reaktywnego charakteryzowali się najgorszą kontrolą glikemii;
4. dzieci chorujące na cukrzycę krócej niż 5 lat odznaczały się najwyższymi wartościami filtracji kłębuszkowej; wartości eGFR były wyższe u chłopców.
5. pacjenci najmłodszy charakteryzowali się najniższymi stężeniami wszystkich markerów uszkodzenia śródbłonna, jednak tylko te dotyczące ADMA przyjmowały wartości statystycznie różne w porównaniu do wartości w podgrupie dzieci starszych;
6. dzieci w wieku pośrednim odznaczały się z najwyższą albuminurią i różniły się pod tym względem istotnie od pozostałych podgrup;
7. pacjenci najstarsi wykazywali najwyższe stężenia wszystkich badanych markerów funkcji endotelium oraz CRP, jednak nie były to wartości statystycznie różne w stosunku do tych z pozostałych podgrup;
8. istnieje liniowa zależność między wartością BMI pacjentów i stężeniami wszystkich badanych markerów dysfunkcji endotelium. Dzieci z cukrzycą i niedoborem masy ciała prezentowały niższe stężenia sICAM, sVCAM-1 i RAGE w stosunku do dzieci z prawidłową masą ciała,
8. pacjenci z nadwagą wykazywali znacząco większą od prawidłowo odżywionych pacjentów albuminurię

9. pacjenci z hiperfiltracją, mieli niższe stężenia większości badanych markerów (sVCAM-1, sE-SELEKTYNA, ADMA i PAI-1) w porównaniu do pacjentów z prawidłowym wskaźnikiem eGFR, jednak wyższe niż grupa kontrolna.
10. pacjenci z hiperfiltracją charakteryzowali się wyższymi stężeniami hemoglobiny glikowanej.
11. nasilenie stanu zapalnego śródbłonna naczyń było niezależne od stopnia wyrównania metabolicznego cukrzycy oraz płci.
12. nie ma istotnych różnic zarówno w zakresie stężeń badanych markerów uszkodzenia śródbłonna, jak i pozostałych ocenianych parametrów pomiędzy podgrupami pacjentów z i bez albuminurii.
13. PAI-1, sE-SELEKTYNA i sICAM-1 miały największy wpływ na stopień nasilenia zmian zapalnych w śródbłonku naczyń u dzieci z cukrzycą.

3. Redakcja przedłożonej pracy

Rozprawę rozpoczyna wykaz skrótów, spis treści str. 4-8; następnie typowy układ: wstęp: str. 9-34; cel pracy: str. 34-35; opis grupy pacjentów i metodyka badań: str. 35-42; wyniki: str. 42-89; omówienie wyników: str. 89-98; wnioski: str. 99; streszczenie w języku polskim: str. 100-103; streszczenie w języku angielskim: str. 104-107; spis tabel i spis rycin: str. 108-109. Piśmiennictwo zawiera 274 pozycje, w tym 205 w języku angielskim i 22 od roku 2013, co wymagało od Doktorantki znacznego nakładu pracy w zebraniu odpowiedniej literatury. Pozycja 72 i 147 posiadają oryginalny tytuł po polsku, pozycja 72 wymaga uzupełnienia. Praca napisana jest poprawną polszczyzną, dobrze się ją czyta. Skorygowania wymagają drobne błędy stylistyczne oraz sposób redagowania skrótów – z ujęciem nazw w języku angielskim, jeżeli jest to skrót anglojęzyczny. GAD – oznacza glutamic acid decarboxylase a nie przeciwciała anti-GAD. Należy unikać wielokrotnego przedstawiania tych samych wyników: w tekście, tabelach i na rycinach. Jeżeli chodzi o szatę graficzną wyróżnić należy sposób wykonania rycin. Ryciny przedstawione we wstępie powinny być redagowane w języku polskim (lub polskim z tłumaczeniem na język angielski) tak jak cały tekst Rozprawy. W/w uwagi dotyczące redakcji nie umniejszają w żaden sposób wysokiej wartości merytorycznej Rozprawy.

4. Wartość kliniczna i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz

W dyskusji **lek. Karolina Nocuń-Wasilewska** konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki w odniesieniu do danych z piśmiennictwa polskiego i światowego. Doktorantka podkreśla, że badania nad etiopatogenezą cukrzycy dotyczą w większości przede wszystkim jej wczesnych stadiów, w których obserwowane zmiany są odwracalne, a co za tym idzie efekty

leczenia nefroprotekcijnego - największe. Doktorantka zakwalifikowała do swoich badań dzieci bez innych chorób przewlekłych i zapalnych, tak by ewentualnie wykryte zmiany w stężeniach ocenianych markerów oraz AF mogły być zinterpretowane jako wynikające wyłącznie z samej cukrzycy. W pracy tej skoncentrowano się na ocenie stanu śródbłonka naczyń krwionośnych u dzieci z cukrzycą typu 1. Ważnym osiągnięciem jest udokumentowanie, że już w czasie ujawnienia choroby wykazano znaczące różnice w zakresie stężeń wszystkich sześciu badanych markerów uszkodzenia śródbłonka przy ujemnych wartościach białka c-reaktywnego, podczas gdy wartości wskaźnika autofluorescencji były podobne dla całej analizowanej populacji. Wobec tego wzrost stężenia markerów pojawił się jeszcze przed utrwaleniem zmian naczyniowych w bardzo wczesnym etapie choroby. Towarzyszyło temu zjawisko hiperfiltracji. Wyniki badań własnych Doktorantki zaprzeczyły istnieniu zależności między ADMA i stopniem wyrównania metabolicznego choroby, natomiast potwierdziły korelacje ADMA z: filtracją kłębuszkową - ujemną, czasem trwania cukrzycy i stopniem odżywienia pacjentów - dodatnią. Dodatkowo wykazano dodatnie zależności stężenia ADMA z wiekiem pacjentów, pozostałymi wskaźnikami uszkodzenia śródbłonka naczyniowego oraz ze stopniem nasilenia zmian zapalnych w śródbłonku naczyniowym. Przemawia to za współdziałaniem ADMA w procesie zapalnym śródbłonka, nasilającym się wraz z wiekiem pacjentów.

Zgodnie z wynikami badań Doktorantki układ aktywatora i inhibitora plazminogenu, który zaangażowany jest w degradację macierzy pozakomórkowej w nerkach, poprzez działanie PAI-1 odgrywa kluczową rolę w remodelingu sprzyjającemu włóknieniu tkanek w cukrzycy o czym może świadczyć ujemna korelacja PAI-1 ze wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej czasem trwania choroby oraz stężeniem hemoglobiny glikowanej. Zaskakująco natomiast poziomy RAGE były najwyższe u pacjentów z najlepszą kontrolą glikemii ale z drugiej strony wykazano dodatnie zależności między RAGE i wiekiem pacjentów, ich BMI, czasem trwania cukrzycy.

Uzyskane w Rozprawie wyniki zachęcają do wykonywania badań prospektywnie – np. w odstępach rocznych - dla oceny przebiegu klinicznego wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych i wdrożenia lub kontynuacji działań profilaktycznych.

W grupie wszystkich badanych dzieci z cukrzycą typu 1 Doktorantka potwierdziła, że w przypadku sVCAM-1 i PAI-1 istnieje ujemna korelacja pomiędzy tymi markerami a stężeniem HbA1c jako, że zła kontrola glikemii jest istotnym czynnikiem ryzyka powikłań w cukrzycy, Doktorantka zakładała istnienie odwrotnej zależności. **Lek. Karolina Nocuń-Wasilewska** zwraca uwagę, że wytłumaczeniem może być fakt, iż dzieci chorujące na cukrzycę z najlepszą kontrolą glikemiczną charakteryzowały się również najniższymi wskaźnikami filtracji kłębuszkowej i chorowały na cukrzycę dłużej niż pacjenci z niższymi stężeniami markerów uszkodzenia śródbłonka.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki sugerują przewagę PAI-1 i sE-SELEKTYNY nad innymi wskaźnikami dysfunkcji śródbłonka jako czynników prognostycznych w odniesieniu do funkcji nerek u dzieci z cukrzycą typu 1, co jest spostrzeżeniem nowatorskim.

Niezmiernie ważną obserwacją, było także stwierdzenie, że wzrost stężeń markerów dysfunkcji endotelium, którym towarzyszy podwyższony wskaźnik BMI, może świadczyć dodatkowo o istnieniu stanu zapalnego śródbłonka w przebiegu rozwijającego się zespołu metabolicznego. Współistnienie tych dwóch stanów zwiększa istotnie ryzyko powikłań angiopatycznych, w tym cukrzycowej choroby nerek.

Ciekawą obserwacją z praktycznego punktu widzenia, co Doktorantka podkreśla, jest fakt, że pacjenci z hiperfiltracją charakteryzowali się wyższymi stężeniami hemoglobiny glikowanej, co jest kolejnym dowodem na to, że złe wyrównanie glikemii zwiększa ryzyko wystąpienia hiperfiltracji.

Zachęcam gorąco Doktorantkę do kontynuacji badań z rozszerzeniem grupy pacjentów co podniosłoby walory przyszłych publikacji.

Sformułowanych 6 wniosków stanowi w pełni odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

WNIOSEK KOŃCOWY

Biorąc pod uwagę nowoczesność, wartość merytoryczną pracy, ważny aspekt kliniczny i praktyczny oraz przeprowadzenie rzeczowej dyskusji oceniam Rozprawę jako spełniającą wymagania stawiane rozprawom na **stopień doktora nauk medycznych** określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882 z późn. zm.).

Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie **lek. Karoliny Nocuń-Wasilewskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę innowacyjny charakter badań oraz duży wkład pracy Doktorantki włożony w opracowanie rozprawy doktorskiej, mam zaszczyt wnioskować o przyznanie pracy wyróżnienia.

6356670 Prof. dr hab. n. med.
Maria Szczepańska
Specjalista pediatr., nefrolog
nefrolog dziecięcy

Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska