

Katedra Chorób Naczyń i Chorób Wewnętrznych, CM UMK
Klinika Chorób Naczyń i Chorób Wewnętrznych
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela w Bydgoszczy
ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz
tel/fax. +48 52 36 55 347
katnacz@cm.umk.pl; jb112233@cm.umk.pl



UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Bydgoszcz, dn. 17.12.2020r.

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lekarz Melanie Victorii Wielickiej

pt.: *Ocena makrokrążenia i mikrokrążenia skórniego u dzieci z cukrzycą typu 1 i autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy*

Powikłania makro- i mikronaczyniowe cukrzycy typu 1 stanowią istotny problem we współczesnej opiece zdrowotnej, szczególnie, że dotyczą dzieci i osób młodych oraz wiążą się z poważnym inwalidztwem (ślepotą, incydenty sercowo-naczyniowe, konieczność leczenia nerkozastępczego) i skróceniem czasu życia. Znaczenie tych powikłań oraz wprowadzanie nowych leków hipoglikemizujących (np. floszyny, agoniści receptora GLP-1), które wykazują wyraźne działanie kardioprotekcyjne przy umiarkowanym efekcie obniżającym stężenie hemoglobiny glikowanej, powoduje, że w ostatnich latach zmienia się paradygmat leczenia cukrzycy typu 2, z glukocentrycznego na kardiowaskulocentryczny. Rozprawę doktorantki należy więc postrzegać, jako głos za rozszerzeniem tego nowego spojrzenia diagnostyczno- leczniczego także na pacjentów z cukrzycą typu 1.

W swojej rozprawie doktorantka postawiła sobie za cel weryfikację hipotezy, że nakładanie się dwóch chorób autoimmunologicznych, cukrzycy typu 1 i autoimmunologicznego zapalenia tarczycy, choroby Hashimoto, przyspiesza proces uszkodzenia struktury i funkcji makro- i mikrokrążenia. Hipoteza ta wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad tzw. „zespołami nakładania”. Synergistyczny lub addycyjny efekt patogenny współistnienia dwóch jednostek chorobowych był znany od lat w hepatologii, gastroenterologii i reumatologii. Ostatnio jest tematem badań w innych dziedzinach interny, jak chociażby pulmonologii (nakładanie się POCHP i astmy). Sumacyjny efekt stopnia nasilenia zaburzeń autoimmunologicznych na przebieg chorób sercowo- naczyniowych udowodniono także na przykładzie schorzeń tkanki łącznej i zespołu antyfosfolipidowego, który charakteryzuje ryzyko

powikłań zakrzepowo- zatorowych proporcjonalne do liczby spełnionych laboratoryjnych kryteriów diagnostycznych. Wykazano ponadto przeciwmiażdżycowe działanie leków o efekcie przeciwzapalnym (np. rosuwastatyny w badaniu JUPITER, Canakinumabu [anty-PCSK-9] w badaniu CANTOS, czy metotrexatu w badaniu CIRT). Doktorantka rozwinęła tę problematykę dodatkowo w zakresie angiodiabetologii. Podkreślić należy, że swoje badania doktorantka przeprowadziła na trudnej klinicznie grupie pacjentów, jaką są dzieci. Jednak tylko ta grupa osób badanych pozwala na ocenę problemów naczyniowych u chorych na cukrzycę typu 1 na etapie uszkodzenia niemego klinicznie, który jest najbardziej atrakcyjny dla wdrażania metod terapeutycznych ukierunkowanych na zatrzymanie lub spowolnienie procesu uszkodzenia i dysfunkcji naczyń. **Z powyższych powodów rozprawę doktorską lekarz Melanie Victorii Wielickiej należy uznać za wartościowe dzieło naukowe o walorach praktycznych.**

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl 5 publikacji, dwóch poglądowych oraz trzech oryginalnych. W trzech doktorantka jest wymieniona, jako jeden z dwóch równorzędnych pierwszych autorów, a w dwóch jest trzecim autorem. Wkład autorski doktorantki w powstanie poszczególnych manuskryptów jest opisany na końcu prac oryginalnych oraz w oświadczeniu promotora i współautorów. Wartość bibliometryczna przedstawionych do recenzji artykułów wynosi: IF 5.452 oraz 300 pkt. MNiSzW. Publikacje będące składową cyklu były wcześniej poddane recenzji, pozytywnie zweryfikowane i opublikowane lub przyjęte do druku w punktowanych czasopismach. Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie jednak przedstawić pewne uwagi odnośnie całości.

Wstęp

Zgodnie z zasadami powinien przedstawiać aktualny stan wiedzy dotyczącej podjętego w pracy problemu oraz prezentować przesłanki skłaniające autorkę do zajęcia się tematem. Zgodnie z tym, doktorantka zapoznała czytelnika z epidemiologią cukrzycy, wskazując na znaczący wzrost zapadalności na cukrzycę typu 1 w ostatnich latach, zarówno w Polsce, jak i na świecie. W dalszej części wstępu doktorantka krótko i kompetentnie przedstawiła informacje dotyczące patogenezy uszkodzenia makro- i mikrokrążenia w przebiegu cukrzycy oraz potencjalne znaczenie ich wykrywania na etapie subklinicznym. Weryfikacji wymagają jednak stwierdzenia:

- na str.9: „w innym badaniu z 2010 roku, wykazano, że wskaźnik pulsacyjności był znacząco wyższy u dzieci z cukrzycą typu 1, zwłaszcza u tych, u których dodatkowo zdiagnozowano insulinooporność, nadciśnienie tętnicze czy otyłość”, które stoi w sprzeczności z patogenezą cukrzycy typu 1 (chodzi o „insulinooporność” u pacjenta z typem 1 cukrzycy) oraz interpretacją wartości wskaźnika pulsacyjności (PI) przedstawioną w dalszych częściach rozprawy i w

artykułach nr 4 i 5, z których wynika, że „starzenie się” tętnic wiąże się ze spadkiem wartości PI;

- na str. 9: „wskaźnik pulsacyjności może być uważany za użyteczny parametr w ocenie oraz przewidywaniu powikłań cukrzycy zarówno mikro- jak i makronaczyniowych”, w kontekście treści pracy pogładowej i oryginalnej [artykuł 4 i 5] oraz wykorzystania przez doktorantkę wskaźnika pulsacyjności tylko w ocenie nasilenia makroangiopatii.

Cel pracy

Doktorantka przedstawiła trzy jasno sformułowane cele (str.11), które realizowała w poszczególnych pracach składających się na cykl publikacji. Z obowiązku recenzenta dodam jednak, że:

- odnośnie celu nr 1 [artykuł nr 1 i 2] należy stwierdzić, iż przezskórne ciśnienie parcjale tlenu (TcPO₂) jest wprawdzie uważane za parametr oceny mikrokrażenia, jednak jego wartość zależy także wielu innych czynników, jak: ciśnienie parcjale tlenu w powietrzu oddechowym, funkcja płuc (wentylacyjna, dyfuzyjna), rzut minutowy serca, nasilenie współistniejącej makroangiopatii (jest np. markerem niedokrwienia u pacjentów z niedokrwieniem zagrażającym utratą kończyny w skali WIFI), skurcz tętnic i tętniczek, właściwości reologiczne krwi, utrudnienie odpływu żylnego (niewydolność zastawek żylnych, zakrzepica, ucisk żyły, prawokomorowa niewydolność serca), stężenie hemoglobiny, krzywa dysocjacji hemoglobiny, współistnienie obrzęku, stanu zapalnego skóry i neuropatii autonomicznej odpowiedzialnej m.in. za zmiany dystrybucji przepływu krwi w skórze i tkankach głębokich. Heterogenność grupy badanej w tym zakresie mogła wpływać na wartości uzyskanych pomiarów i na siłę wnioskowania na ich podstawie. Należałoby to uwzględnić w ograniczeniach pracy. Dopiero testy prowokacyjne: PORH i VO [artykuł 2] wydają się być bardziej swoiste dla oceny rezerwy rozkurczowej mikrokrażenia zależnej od funkcji śródbłonna.
- odnośnie celów 2 i 3 [artykuły 3 i 5] należy stwierdzić, iż przyjęta w rozprawie metodologia trzech badań przekrojowych nie daje możliwości wykazania wpływu jednego czynnika na drugi (nie ma interwencji). W przekrojowym modelu badawczym można określić tylko istnienie związku statystycznego między jednym stanem a drugim.

Materiał i metody

W rozdziale tym doktorantka przedstawia metodologię zastosowaną w trzech pracach oryginalnych będących przedmiotem oceny. Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że:

- doktorantka w poszczególnych pracach badała różną liczbę dzieci z cukrzycą typu 1 z lub bez nakładania choroby Hashimoto, po 25 w odniesieniu do badania mikrokrażenia i po 19 w odniesieniu do

makrokrażenia. Mimo braku znamienności statystycznych większości różnic między podgrupami, należy przyjąć, że grupa badana była jednak heterogenna pod względem czasu trwania cukrzycy, sposobu leczenia i stopnia wyrównania (zakres HbA1c 5,8-13,4-!!!), co wynika chociażby z Tab.1 artykułu nr 3. W Tabeli 1 artykułu nr 5 różnica poziomu HbA1c była istotnie statystycznie większa w grupie z nakładaniem się cukrzycy typu 1 i choroby Hashimoto.

- wobec postawionych przez doktorantkę hipotez, że **(a)** współistnienie dwóch chorób autoimmunologicznych (cukrzycy typu 1 i choroby Hashimoto) ma silniejsze działanie proaterogenne, niż pojedyncza jednostka chorobowa, oraz że **(b)** patomechanizmem odpowiedzialnym za ten efekt „nakładania” miałyby być silniejsza reakcja zapalna, to na liście badań laboratoryjnych wykonywanych w pracach zabrakło mi: stężenia CRP, hs-CRP, miana autoprzeciwciał przeciwtarczycowych, miana autoprzeciwciał związanych z cukrzycą, leukocytozy, limfocytozy, innych biomarkerów reakcji zapalnych i autoimmunologicznych (np. IL-1 β , TNF- α , aktywność cytotoksyczna limfocytów) oraz biomarkerów zapalenia w ścianie naczynia (np. MMP-9, VEGF), które odzwierciedlałyby związek nasilenia procesu autoimmunologicznego w tarczycy i trzustce z reakcją zapalną w ścianie naczynia ulegającej uszkodzeniu lub dysfunkcji. Podane wartości TSH, wolnych hormonów tarczycy i stężenia lipidów osocza niestety nie wypełniają tej luki, gdyż wskazują na funkcję endokrynną przysadki i tarczycy, a nie na nasilenie procesów immunologicznych związanych z zapaleniem tej ostatniej.
- badanie TcPO2 [artykuł nr 2] ma swoje ograniczenia w ocenie mikrokrażenia, które wymieniono wyżej, w uwagach dotyczących „Celów pracy”;
- badanie TcPO2 doktorantka przeprowadziła w miejscu dość nietypowym, bo na przedramieniu. Może to utrudniać porównanie wyników z pracami innych badaczy, na co doktorantka sama wskazuje na stronie 8 artykułu nr 2.
- w badaniu TcPO2 doktorantka pominęła pomiar tego parametru na klatce piersiowej i nie wyliczyła regionalnego wskaźnika perfuzji (RPI), proponowanego w pracy współautorki doktorantki z 2017 r. (Forum Medycyny Rodzinnej 2017, tom 11, nr 2, 80–88)
- w ocenie makrokrażenia, obok wskaźnika pulsacyjności (PI), współczynnika oporowości (RI) oraz wskaźnika kostka- ramię (WKR, ABI), doktorantka mogła bez problemu wykorzystać wartość ciśnienia tętna (Tab.1, artykuł 5) oraz ocenę grubości kompleksu intima- media (KIM) w badanych tętnicach.

Wyniki

- stwierdzenie (str. 14): „upośledzona funkcja mikrokrążenia skórniego może ulec normalizacji po zastosowaniu terapii hiperlipemizującej” wymaga korekty, gdyż, jak sędzę, chodziło o terapię **hipolipemizującą**;
- wyniki i metodologia badań raczej nie uzasadniają stwierdzeń: **(a) ze str.15 rozprawy:** „uwzględnienie poziomu cholesterolu całkowitego i trójglicerydów [powinno być: triglicerydów] skutkuje brakiem istotnych różnic w wielkości przepływu skórniego pomiędzy badanymi grupami. Na tej podstawie wyciągnęliśmy wniosek, iż zastosowanie interwencji farmakologicznej obniżającej poziom lipidów w grupie pacjentów, którzy zachorowali poniżej 14 roku życia i chorują krótko, może odwrócić wczesne zaburzenia funkcji mikrokrążenia skórniego.” i **(b) ze str. 18 rozprawy:** „Wniosek płynący z uzyskanych wyników stanowi istotny wkład do dyskusji na temat potrzeby wprowadzenia leków hipolipemizujących do terapii u dzieci z cukrzycą typu 1 i współistniejącymi chorobami autoimmunologicznymi”.
Moje wątpliwości wynikają z faktu, że w przedstawionych publikacjach doktorantka nie wdrożyła interwencji lekami hipolipemizującymi i nie oceniła jej efektu w badaniu prospektywnym, najlepiej randomizowanym. Doktorantka stwierdziła tylko:
 - a) że pacjenci z cukrzycą typu 1, mimo eutyreozy i podobnych stężeń hormonów tarczycowych, mieli wyższe stężenia cholesterolu całkowitego i triglicerydów niż osoby z grupy kontrolnej (w pracy tej nie badano pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy) [Tab.1, artykuł 2]
 - b) że 20-30% pacjentów z cukrzycą typ 1 miało wskazania do włączenia leczenia hipolipemizującego [artykuł 5]. Doktorantka nie podaje jednak, do której grupy ryzyka zaliczyła swoich pacjentów, nie podaje też odniesienia do aktualnych wytycznych.
 - c) że wprowadzenie poprawki na stężenia cholesterolu całkowitego, triglicerydów, TSH i FT4 niwelowało znamienność statystyczną różnicy TcPO2_T_zero między pacjentami z cukrzycą typu 1 i grupą kontrolną [Tab. 2, artykuł 2],
 - d) że stężenie cholesterolu całkowitego było niezależnym czynnikiem determinującym wartość TcPO2_T_zero u pacjentów z cukrzycą typu 1 [Tab.3, artykuł 2], który jest jednak parametrem zupełnie niezależnym od funkcji mikrokrążenia (faza maksymalnego niedokrwienia, Ryc.1). Doktorantka nie wykazała ponadto niezależnego wpływu stężenia lipidów osocza na wartości parametrów kapilaroskopii (mikroangiopatii) [artykuł 3] oraz parametrów oceniających elastyczność naczyń (makroangiopatii) [artykuł 5].
- w omówieniu rozprawy i artykule nr 2 należałoby przedyskutować wymienione wyżej ograniczenia interpretacyjne wyniku badania TcPO2,

- w artykułach 3 i 5 doktorantka nie podaje informacji, ilu chorych z chorobą Hashimoto otrzymywało substytucję hormonalną w celu uzyskania eutyreozy; a może choroba Hashimoto była zdiagnozowana tylko na podstawie obecności przeciwciał i nie powodowała zaburzeń funkcji tarczycy?
- chyba nie jest prawdą, że: *„Wyższa wartość TcPO2 podczas testu PORH wskazuje na gorszą wydolność mikrokrążenia skórniego”* [str.15 rozprawy], gdyż wzrost TcPO2 podczas czynnego przekrwienia po niedokrwieniu świadczy o większej rezerwie rozkurczowej mikrokrążenia zależnej od śródbłonka. Tak przynajmniej interpretuje się wyniki badania przy pomocy laserowego przepływomierza dopplerowskiego [LDF], czy badania rozszerzalności tętnicy ramiennej w odpowiedzi na niedokrwienie [FMD]. Interpretację taką sugeruje też treść Ryciny 1 w artykule 2. Ponadto z treści artykułu nr 2 wynika, że u pacjentów z cukrzycą typu 1 TcPO2 było znamienne wyższe niż w grupie kontrolnej, ale tylko w zakresie TcPO2_T_zero, który jest parametrem mierzonym na końcu fazy niedokrwienia testu PORH i jest zupełnie niezależny od funkcji śródbłonka. Moim zdaniem, wyższe wartości TcPO2_T_zero między grupami w artykule nr 2 należy interpretować jako wynik trudności właściwego uciśnięcia tętnicy ramiennej mankietem sfigmomanometru u pacjentów z cukrzycą, np. wskutek usztywnienia ściany tętnicy, czego nie udało się jednak potwierdzić w artykule nr 5. Natomiast fakt uzyskania podobnych wartości TcPO2_T_recovery w obu grupach badanych przeczyłby istnieniu zaburzeń rezerwy rozkurczowej zależnej od funkcji śródbłonka u badanych chorych na cukrzycę typu 1.
- nie wiadomo, na podstawie jakich danych doktorantka pisze w rozprawie, że: *„względny obszar pokryty kapilarami w warunkach podstawowych jest najbardziej odpowiednim parametrem opisującym mikrokrążenie skórne u dzieci”*, skoro u pacjentów ze współistnieniem cukrzycy typu 1 i choroby Hashimoto parametry kapilaroskopii były znamienne statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej, nie tylko w zakresie badania podstawowego (*Coverage*), ale także po teście PORH (*Coverage*) i VO (*Coverage, Distance*) [Tab.2, str.71 artykułu nr 3 i 56 rozprawy]. Ponadto część różnic w zakresie tych parametrów pozostawała znamienna względem grupy kontrolnej także po uwzględnieniu poprawki na stężenie cholesterolu całkowitego. Nie odnotowano natomiast znamiennych statystycznie różnic parametrów mikrokrążenia między podgrupami pacjentów z cukrzycą typu 1, z i bez choroby Hashimoto, poza *„coverage after VO”* z poprawką na stężenie cholesterolu. Moim zdaniem, w podsumowaniu artykułu nr 3, można by stwierdzić, że współistnienie dwóch chorób autoimmunologicznych prowadzi do wystąpienia subklinicznych zaburzeń struktury i funkcji mikrokrążenia wcześniej niż u pacjentów z izolowaną cukrzycą typu 1. Jednak znaczna rozpiętość czasu trwania cukrzycy w badanej grupie (0,7-14,4 lat), mała liczebność badanych oraz brak analizy wieloczynnikowej w artykule nr 3 nie uzasadniają drugiego zdania

wniosku nr 2 o braku wpływu czasu trwania cukrzycy na obserwowane różnice.

- w omówieniu wyników w artykule nr 5 zabrakło stwierdzenia, że wskaźnik pulsacyjności (PI) zależy nie tylko od elastyczności dużych naczyń, ale także od oporu obwodowego, na co wskazuje prof. Kozera w pracy cytowanej przez doktorantkę [artykuł 4, str. 205].
- nie jest jasne, dlaczego tytuł artykułu 5 dotyczy wskaźnika pulsacyjności (PI), skoro znamieny efekt grupy w analizie MANOVA wykazano także dla współczynnika oporowości (RI), a znamieną statystycznie różnicą między grupami DM1+AIT i grupą kontrolną w teście post hoc dotyczyła tylko współczynnika oporowości (CCA_RI)- Tabela 2? W tym kontekście nie jest także jasne, dlaczego nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej względem CCA_RI, skoro dokonano tego w odniesieniu do CCA_PI?
- nie wiadomo, na jakiej podstawie w artykule 5 wysunięto wniosek: „*This may serve as a valuable addition to the discussion on the need for introducing lipid-lowering therapy in children with type 1 diabetes and coexisting autoimmune diseases*” skoro stężenie LDL nie było niezależnym czynnikiem determinującym wartość CCA_PI (Tab.3), przyjętego w pracy parametru sztywności naczyń elastycznych?

Wnioski

Wniosek 1, dotyczący roli lipidów, a raczej stężenia cholesterolu całkowitego [Tab. 3 w artykule nr 2], w patogenezie dysfunkcji mikrokrążenia u pacjentów z cukrzycą typu 1, oparty o badanie TcPO₂, wydaje się nie być poparty wynikami przedstawionymi w artykule, gdyż istotna statystycznie różnica między pacjentami z cukrzycą typu 1 i grupą kontrolną dotyczyła tylko wartości TcPO₂ uzyskanej w późnej fazie eksperymentalnego niedokrwienia.

Wniosek 2 wymaga weryfikacji, gdyż różnice w zakresie parametrów mikrokrążenia między grupą kontrolną i pacjentami ze współistnieniem cukrzycy typu 1 i choroby Hashimoto dotyczyły nie tylko funkcji, ale też struktury kapilar (*coverage, distance*). Jak wspomniano wyżej, drugie zdanie wniosku, dotyczące niezależności stopnia uszkodzenia naczyń od czasu trwania cukrzycy, nie wydaje się być poparte wynikami zawartymi w pracy.

Bibliografia

Spis cytowanego piśmiennictwa (str. 20-24), w większości anglojęzycznego, przygotowany jest wg kolejności cytowania w rozprawie, ale wg różnych reguł. Wymaga to uporządkowania. Spośród cytowanych 60 pozycji tylko 22 (36,6%) pochodzi z ostatnich 5 lat.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy przedstawionej mi do recenzji. Dysertacja lekarz Melanie Victorii Wielickiej stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego i wieloaspektowego problemu naukowego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w zakresie tematyki poruszonej w dysertacji oraz umiejętnością prowadzenia pracy naukowej. Tym samym spełnione zostają wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.)".

W związku z tym zwracam się do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z **wnioskiem o dopuszczenie lekarz Melanie Victorii Wielickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kierownik
Katedry i Kliniki Chorób Naczyń
i Chorób Wewnętrznych
dr hab. n. med. Jacek Budzyński

(-) dr hab. n. med. Jacek Budzyński, prof. Uniwersytetu
Kierownik Katedry Chorób Naczyń i Chorób Wewnętrznych,
WNoZ, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w
Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu