



prof. dr hab. n. med. Marek Koziński, FESC
Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersyteckie Centrum Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Anny Piórkowskiej pt. „Ocena zależności między stężeniem melatoniny, witaminy D, wybranych adipocytokin i wykładników stanu zapalnego a poziomem metabolicznego wyrównania cukrzycy typu 2” napisanej pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Karoliny Szewczyk-Golec, prof. UMK i promotora pomocniczego dr n. med. Anny Kamińskiej

Mianem cukrzycy określa się grupę chorób metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią spowodowaną defektem wydzielania i/lub działania insuliny. Przewlekła hiperglikemia prowadzi do uszkodzenia i niewydolności wielu narządów, w tym oczu, nerwów, nerek, serca i naczyń krwionośnych. Przewlekłe powikłania cukrzycy obejmują m.in. retinopatię i zaćmę prowadzące do ślepoty, cukrzycową chorobę nerek skutkującą koniecznością leczenia nerkozastępczego, przyspieszoną miażdżycę wiążącą się z podwyższonym ryzykiem zawału serca, udaru mózgu i miażdżycy tętnic obwodowych. Ta ostatnia w połączeniu z neuropatią prowadzi do zespołu stopy cukrzycowej, często prowadzącego do amputacji. Konsekwencje cukrzycy obejmują zwiększoną chorobowość i redukcję oczekiwanej długości życia. Niestety występowanie cukrzycy jest duże i szybko rośnie, zwłaszcza w krajach o niskim i średnim dochodzie. Wg danych WHO odpowiednio 108 milionów i 422 miliony pacjentów chorowało na świecie na cukrzycę w 1980 r. i 2014 r. Szacowano, że w 2014 r. cukrzyca występowała u 8,5% dorosłych na świecie. Cukrzyca typu 2 stanowi około 80% przypadków cukrzycy i charakteryzuje się insulinoopornością wraz z postępującym defektem wydzielania insuliny. Kluczowe czynniki patogenetyczne cukrzycy typu 2 obejmują nadwagę i otyłość ze zwiększoną ilością trzewnej tkanki tłuszczowej, niską aktywność fizyczną i u części pacjentów uwarunkowania genetyczne (głównie dziedziczenie wielogenowe). Duże nasilenie hiperglikemii określane mianem złego wyrównania metabolicznego uznawane jest za jeden z czynników ryzyka powikłań cukrzycy. Z kolei aktywacja zapalna u chorych z cukrzycą stanowi jeden z prawdopodobnych patomechanizmów przyspieszonej miażdżycy w tej grupie chorych. Z uwagi na powyższe,

wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za trafny, cenny z naukowego punktu widzenia i klinicznie istotny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę liczącą 199 stron monografii przedstawiającej przesłanki do przeprowadzenia badania, cel, metodykę, przebieg, wyniki i wnioski z oryginalnego badania naukowego przeprowadzonego przez Doktorantkę. Treść rozprawy uzupełniają wstęp, dyskusja, piśmiennictwo, spis treści, wykaz skrótów, spisy tabel i rycin, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz kserokopia zgody komisji bioetycznej. Rozprawa zawiera 51 rycin i 18 tabel.

Wstęp stanowi bardzo rozbudowane wprowadzenie do tematyki badawczej i uzasadnienie wyboru tematu. We Wstępie Autorka omawia historię badań nad cukrzycą, definicję cukrzycy, jej epidemiologię, podział, patofizjologię i czynniki ryzyka, przewlekłe powikłania, a także badane w projekcie biomarkery laboratoryjne (rezystyna, adiponektyna, leptyna, interleukina 6, zmienione oksydacyjnie cząsteczki LDL, hydroksylowe pochodne wit. D, melatonina) i ich rolę w organizmie człowieka. Niewątpliwym atutem wstępu jest użycie 14 rycin, które uatrakcyjnijają lekturę tej części rozprawy.

Kolejny rozdział to „Cel pracy”. Rozpoczynając jego lekturę i czytając wcześniej tytuł pracy, oczekiwałem sformułowania „Celem rozprawy była ocena zależności między stężeniem melatoniny, witaminy D, wybranych adipocytokin i wykładników stanu zapalnego a poziomem metabolicznego wyrównania cukrzycy typu 2”. Zostałem jednak zaskoczony przez Doktorantkę, która postanowiła jednak sformułować 8 celów szczegółowych obejmujących: „1). Ocenę parametrów antropometrycznych u osób chorujących na cukrzycę typu 2, u osób z grup podwyższonego ryzyka rozwoju DM2, tj. u chorych na chorobę otyłościową oraz u osób z nadwagą, a także u osób z prawidłową masą ciała, stanowiących grupę kontrolną. 2). Oznaczenie i porównanie stężenia melatoniny w czterech badanych grupach. 3). Oznaczenie i porównanie stężenia adiponektyny, leptyny, rezystyny, wisfatyny oraz interleukiny 6 w czterech badanych grupach. 4). Oznaczenie i porównanie stężenia witaminy D w grupie osób z DM2 i w grupie osób otyłych. 5). Oznaczenie i porównanie stężenia kallistatyny i iryzyny w grupie osób z DM2 i w grupie osób otyłych. 6). Oznaczenie i porównanie stężenia oxLDL w grupie osób z DM2 i w grupie osób otyłych. 7). Ocena przydatności badanych parametrów w określaniu ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2. 8) Odniesienie uzyskanych wartości do powszechnie stosowanych parametrów metabolicznego wyrównania cukrzycy typu 2 celem znalezienia ewentualnych nowych biomarkerów prawidłowej kontroli tej choroby.” Obecne w tytu rozprawy wyrównanie metaboliczne pojawia się jedynie w celu nr 8. Z kolei konstrukcja badania (próba kliniczno-kontrolna) uniemożliwia wiarygodną realizację celu nr 7. W tym przypadku niezbędne byłoby badanie kohortowe. Na str. 63 Doktorantka pisze także „celem niniejszych badań było (...)

określenie prawdopodobnych nowych wskaźników wyrównania glikemii”. W mojej ocenie takiego celu nie można zrealizować w małym badaniu kliniczno-kontrolnym odnoszącym stężenie hemoglobiny glikowanej do stężeń innych biomarkerów. Ewentualne znalezienie dodatniej korelacji między stężeniem hemoglobiny glikowanej a ocenianym biomarkerem laboratoryjnych nie musi wcale oznaczać, że wartości obu tych parametrów są uwarunkowane przede wszystkim stężeniem glukozy u uczestników badania.

Kolejny rozdział rozprawy to „Materiał i metody”. W tej części pracy dowiadujemy się, że do badania włączono 46 pacjentów z cukrzycą typu 2 (pacjenci Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Szpitala Uniwersyteckiego im. Dr. A. Jurasza w Bydgoszczy), 30 osób z otyłością, 23 osoby z nadwagą oraz 34 osoby z prawidłową masą ciała bez cukrzycy. Nie znalazłem w tekście rozprawy informacji, czy i w jaki sposób osoby z otyłością, nadwagą i prawidłową masą ciała badano pod kątem występowania cukrzycy. Doktorantka formułuje kryteria włączenia i wyłączenia z badania. Dla mnie pozostaje niejasne, czy kryteria wykluczania dotyczyły tylko pacjentów z cukrzycą typu 2 czy wszystkich grup. Jednym z kryteriów wykluczenia był „ostry stan chorobowy”. Jeśli takich chorych wykluczano z badania, to rodzi się pytanie, jaki był powód hospitalizacji pacjentów z cukrzycą typu 2? Następnie Autorka precyzuje, jak dokonywano pomiarów wzrostu i masy ciała pacjentów. Kolejne podrozdziały dotyczą metodyki pobierania krwi do badań laboratoryjnych, przechowywania osocza i oznaczeń laboratoryjnych. Opisy oznaczeń laboratoryjnych są bardzo szczegółowe, ale brakuje w nich istotnych informacji, tj. minimalnych wykrywanych stężeń dla poszczególnych biomarkerów (ang. *level of detection*) oraz zmienności oznaczeń (ang. *intra- and inter-assay coefficients of variability*). Brakuje także opisu metodyki oznaczeń hemoglobiny glikowanej.

W rozdziale Wyniki Doktorantka wszechstronnie przeanalizowała uzyskane w badaniu dane. W mojej ocenie bardzo dużym ograniczeniem rozprawy jest brak informacji o stosowanej u uczestników badania farmakoterapii (farmakoterapia cukrzycy i chorób współistniejących) oraz ograniczone dane o chorobach towarzyszących (choroba niedokrwienna serca i inne kliniczne manifestacje miażdżycy, niewydolność serca, nadciśnienie tętnicze, przewlekła choroba nerek etc., znalazłem jedynie informacje dostępne na Rycinie 32, brakuje także danych o występowaniu w/w cech w grupach odniesienia/kontrolnych). Bez wątplenia farmakoterapia i choroby współistniejące mogły mieć u uczestników badania istotny wpływ na stężenia ocenianych biomarkerów laboratoryjnych. Wyniki przedstawione są bardzo szczegółowo, momentami zbyt szczegółowo np. histogramy dla zmiennych wydają się zbędne. Nie wykryto żadnych zależności między ocenianymi biomarkerami laboratoryjnymi a stężeniem hemoglobiny glikowanej (Tabela 8), do czego nawiązywał temat rozprawy. Do rozdziału wyniki

prawdopodobnie wkradły się błędy np. wydaje się niemożliwe, aby minimalne stężenie hemoglobiny glikowanej w grupie pacjentów z cukrzycą wynosiło 2,6%, a maksymalne stężenie 15,2% (Tabela 4), wg Ryciny 28 co najmniej 1 osoba z cukrzycą miała >75 lat, co stanowiło kryterium wykluczenia z badania.

Dyskusja stanowi bez wątpienia atut rozprawy. Została starannie przemyślana i napisana rzeczowo. Autorka podzieliła ją na podrozdziały. Dyskusja rozprawy doktorskiej lek. Anny Piórkowskiej zawiera omówienie oraz trafną próbę interpretacji uzyskanych wyników w kontekście danych z literatury.

Doktorantka sformułowała aż 12 wniosków. Niestety wnioski jedynie częściowo znajdują oparcie w badaniach przeprowadzonych przez Doktorantkę, a w pozostałej części mają charakter hipotez/spekulacji, które nie były adekwatnie weryfikowane w projekcie badawczym. Wniosek nr 1 – nie zgadzam się, że przeprowadzone badanie „wskazuje na udział tej adipokiny (leptyny) w rozwoju cukrzycy i na możliwość zastosowania tego parametru do oceny ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 i jej wczesnej profilaktyki”. Wniosek nr 4 – nie zgadzam się ze stwierdzeniem, aby w badaniu wykazano, iż „w progresji tej choroby (cukrzycy typu 2) uczestniczą również rezystyna i iryzyna”. Wniosek nr 7 [„Istotnie wyższy poziom melatoniny u osób z DM2 może wskazywać na pozytywny wpływ stosowanej farmakoterapii (insulina/metformina) na wydzielanie tego hormonu.] nie wynika z przeprowadzonych badań, a farmakoterapii cukrzycy u uczestników badania w ogóle nie opisano w rozprawie.

Piśmiennictwo rozprawy jest bardzo bogate i aktualne, zostało starannie dobrane, posiada jednolity format i zawiera aż 377 w zdecydowanej większości anglojęzycznych pozycji. Cytowania zostały umieszczone we właściwych miejscach w tekście.

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnym językiem. Jej tekst jest wolny od istotnych błędów stylistycznych, ortograficznych i interpunkcyjnych.

Mam kilka ogólnych uwag dotyczących pracy: i) Rozprawa jest bardzo długa i można ją skrócić o co najmniej 50% bez istotnego wpływu na jej wartość merytoryczną. ii) W pracy brakuje hipotezy badawczej. iii) Nie znalazłem podrozdziału dotyczącego ograniczeń badania (m.in. mała grupa pacjentów z cukrzycą typu 2, brak prospektywnej obserwacji, badanie jednoosrodkowe, zastosowanie testów ELISA – metodyki słabo wystandaryzowanej, o wysokich minimalnych oznaczalnych stężeniach i wysokiej zmienności oznaczeń). iv) Doktorantka w bardzo wielu miejscach rozprawy zamiast słowa „stężenie” używa określenia „poziom”, które choć coraz powszechniejsze nie jest generalnie zalecane przez czasopisma z zakresu diagnostyki laboratoryjnej. v) Większość uczestników badania stanowiły kobiety i do nich przede wszystkim wydają się odnosić uzyskane wyniki. vi) Nie znalazłem, aby praca została do tej pory opublikowana w czasopiśmie naukowym, do czego

gorąco namawiam Autorkę. Będę zobowiązany za ustosunkowanie się Doktorantki do powyższych uwag w trakcie publicznej obrany.

Ocenianą rozprawę doktorską uważam za wartościową pracę naukową o istotnym potencjale publikacyjnym (po uwzględnieniu uwag zawartych w niniejszej recenzji). Badanie przedstawione w monografii zostało starannie zaplanowane i skrupulatnie przeprowadzone. Metodologię badania uważam za adekwatną. Doktorantka szczegółowo przeanalizowała uzyskane dane. Prezentację uzyskanych wyników oraz przeprowadzoną w rozprawie dyskusję uważam za poprawną. Wnioski rozprawy odnoszą się do celów i częściowo do uzyskanych wyników. Chciałbym podkreślić duży nakład pracy Doktorantki włożony w przeprowadzenie badania, zbieranie i analizę danych oraz napisanie rozprawy. Niewątpliwymi atutami rozprawy są: duża liczba ocenianych biomarkerów laboratoryjnych, starannie wykonane ryciny i tabele oraz trafny dobór piśmiennictwa. Uchybienia monografii nie zmieniają mojej pozytywnej oceny pracy. Jestem przekonany, że wszelkie wątpliwości zostaną rozwiane podczas publicznej obrony. Podsumowując, rozprawa doktorska lek. Anny Piórkowskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789)". Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie lek. Anny Piórkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Proszę także Doktorantkę o odpowiedź podczas publicznej obrony na trzy pytania: i) Jakie cechy powinien mieć idealny marker wyrównania cukrzycy? ii) Jakie zna Pani inne niż hemoglobina glikowana wskaźniki wyrównania metabolicznego cukrzycy? Jakie są ich zalety i ograniczenia? iii) Proszę umówić cele leczenia cukrzycy typu 2 oraz rolę interwencji farmakologicznych i nefarmakologicznych w tym zakresie.