

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej lek. Agnieszki Łoś-Stegienty
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych**

Wstęp

Lek. Agnieszka Łoś-Stegienta jest Autorką dysertacji doktorskiej na podstawie cyklu prac pt. „Ocena stanu śródbłonka naczyniowego, przy użyciu innowacyjnej metody – Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF), opartej o fluorescencję NADH, w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach krwionośnych, u osób zdrowych i pacjentów z długotrwałą cukrzycą”. Metoda ta wykorzystuje zmiany intensywności fluorescencji NADH w skórze przedramienia w odpowiedzi na niedotlenienie i reperfuzję. Analiza kształtu sygnału fluorescencji NADPH pozwala na ocenę przepływu mikronaczyniowego odzwierciedlającego stan mikrokrążenia, które często jest upośledzone m.in. w cukrzycy, stąd też jego ilościowa ocena może być wykorzystana do badania wczesnych objawów jego uszkodzenia.

Prace wchodzące w skład Rozprawy zostały opublikowane w latach 2019-2022.

I. Ocena merytoryczna pracy

Cykl prac pt. „Ocena stanu śródbłonka naczyniowego, przy użyciu innowacyjnej metody – Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF), opartej o fluorescencję NADH, w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach krwionośnych, u osób zdrowych i pacjentów z długotrwałą cukrzycą” będący podstawą postępowania o nadanie tytułu doktora nauk medycznych, stanowi spójną całość tematyczną. Lek. Agnieszka Łoś-Stegienta jest pierwszą Autorką trzech z pięciu prac wchodzących w skład cyklu. Tematem wiodącym tych prac jest ocena przydatności klinicznej nowej metody Flow Mediated Skin Fluorescence u pacjentów z cukrzycą bez powikłań, z powikłaniami o charakterze mikro- i makroangiopatii oraz u osób zdrowych w celu oceny funkcji śródbłonka i układu krążenia.

Pierwsza praca z cyklu jest pracą poglądową wprowadzającą w tematykę prac oryginalnych i przedstawia zasadę działania metody FMSF, omawia technikę i przebieg badania, opisuje najistotniejsze parametry, sposób ich analizy oraz interpretacji wyników. Podsumowuje ona dotychczasowe publikacje, w których wykorzystywano technikę Flow

Mediated Skin Fluorescence do oceny zaburzeń mikrokrążenia w diabetologii oraz w innych specjalnościach, m. in. pulmonologii, dermatologii, fizjologii sportu.

Druga z prac pt. „Differentiation of Diabetic Foot Ulcers Based on Stimulation of Myogenic Oscillations by Transient Ischemia” jest pracą oryginalną opublikowaną w czasopiśmie *Vascular Health and Risk Management* w 2021 roku. Jej głównym celem była ocena potencjału techniki FMSF jako narzędzia do predykcji gojenia stopy cukrzycowej. Badaniem objęto 42 pacjentów z długotrwałą cukrzycą (≥ 10 lat trwania) powikłaną zespołem stopy cukrzycowej. Na podstawie uzyskanych wyników pacjentów podzielono na kwartyle. W pracy tej Autorzy wykazali, że pacjenci z najniższym kwartylem wartości HS (hypoxia sensitivity) mieli gorsze rokowanie w zakresie wygojenia owrzodzenia. Charakteryzowali się oni również większą częstością występowania nadciśnienia, hiperlipidemii, chorób sercowo-naczyniowych, neuropatii i nefropatii, jak też mieli znamienne niższy indeks odpowiedzi hiperemicznej (hyperemic response index – HR_{index}), co wskazywało na większą dysfunkcję dużych naczyń w tej grupie pacjentów, co zostało potwierdzone częstszym występowaniem u nich chorób sercowo-naczyniowych. Praca ta była pierwszą, która wykazała, że upośledzenie reakcji mikrokrążenia może być wykorzystywane do identyfikacji przypadków o słabym rokowaniu na wyleczenie.

Trzecia praca w cyklu zatytułowana “Assessment of microvascular function using a novel technique Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) in patients with diabetic kidney disease: A preliminary study” została opublikowana w *Microvascular Research* w 2022 roku. Była ona poświęcona użyteczności metody FMSF do oceny zmian fluorescencji NADPH u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek. Badaniem objęto 84 osoby, w tym 30 z cukrzycową chorobą nerek, 33 z cukrzycą bez powikłań oraz 21 osób zdrowych. Pacjenci z nefropatią mieli istotnie niższe wartości parametru reaktywnej odpowiedzi na przekrwienie (RHR – reactive hyperemia response) ($18,31 \pm 5,06\%$) w porównaniu z osobami zdrowymi ($34,37 \pm 8,18\%$, $p < 0,001$), i pacjentami z cukrzycą bez powikłań ($28,75 \pm 7,12\%$, $p < 0,001$). U osób z cukrzycą bez powikłań parametr RHR był również istotnie niższy w porównaniu z osobami zdrowymi. Podobne zależności wykazano w przypadku średniej wartości parametru $\log(HS)$ w podgrupie z nefropatią ($1,03 \pm 0,5$) w porównaniu z osobami zdrowymi ($1,59 \pm 0,53$, $p < 0,001$) oraz z pacjentami z cukrzycą bez powikłań ($1,73 \pm 0,52$, $p < 0,01$). W pracy tej wykazano także ujemną korelację pomiędzy wartością RHR a stężeniem kreatyniny w surowicy oraz istotną, dodatnią korelację z eGFR. Z kolei $\log(HS)$ był odwrotnie skorelowany ze stężeniem kreatyniny i dodatnio skorelowany z eGFR. Pacjenci z cukrzycową chorobą

nerek i cukrzycą bez powikłań mieli istotnie wyższy poziom końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs – advanced glycation end-products) w porównaniu z osobami zdrowymi. Poziom AGEs był też znamienne wyższy u pacjentów z niskim parametrem RHR w porównaniu z umiarkowanym i wysokim RHR. Nie wykazano natomiast istotnych różnic w parametrze AGEs między grupami log(HS). Autorzy w zakończeniu podkreślili, że wyniki te wymagają dalszej walidacji na większej grupie pacjentów.

Czwarta praca w cyklu (a trzecia oryginalna) współautorstwa kandydatki do tytułu doktora nauk medycznych była poświęcona analizie korelacji pomiędzy parametrami funkcji mikrokrążenia otrzymanymi za pomocą fluorescencji NADH (HR_{index} , HR_{max} oraz MR – metabolic recovery), a wybranymi parametrami klinicznymi i antropometrycznymi u osób z cukrzycą typu 1 oraz ocenie potencjału diagnostycznego techniki FMSF u pacjentów z tym typem cukrzycy. Badaniem objęto 40 chorych z długo trwającą cukrzycą typu 1 (≥ 10 lat trwania) oraz 31 zdrowych ochotników w wieku 30-49 lat. Wykazano silniejszą korelację badanych parametrów z wiekiem niż z obecnością cukrzycy. Niemniej pacjenci z cukrzycą typu 1 miały istotnie niższe wartości HR_{index} w stosunku do osób z grupy kontrolnej. W badaniu zaobserwowano słabą, lecz istotną ujemną korelację między parametrami HR_{index} , a BMI u osób z cukrzycą, nie wykazano natomiast znamiennej korelacji między parametrami odpowiedzi hiperemicznej (HR_{index} i HR_{max}) a czasem trwania choroby lub HbA_{1c} . Na podstawie tych wyników przy zastosowaniu metodologii FMSF stwierdzono, że parametr HR_{max} należy interpretować głównie jako parametr naczyniowy, a MR jako parametr metaboliczny.

Piąta praca współautorstwa lek. Agnieszki Łoś-Stegienty jest listem do redakcji, pt. „Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) Technique for Studying Vascular Complications in Type 2 Diabetes” opublikowanym w Journal of Diabetes Science and Technology w 2019 roku. Praca ta skrótowo opisuje potencjał diagnostyczny metody FMSF u osób z cukrzycą typu 2. Głównym celem było przedstawienie możliwości techniki FMSF w przewidywaniu występowania powikłań związanych z chorobą sercowo-naczyniową (CVD) w miarę postępu cukrzycy. Badaniem objęto 70 osób w wieku $63 \pm 8,1$ lat, z długo trwającą ($14,6 \pm 7,4$ lat), przewlekłe źle wyrównaną (HbA_{1c} $8,2 \pm 1,4\%$) cukrzycą typu 2 i otyłością. Uczestników badania podzielono na 2 grupy: bez choroby sercowo-naczyniowej (CVD – cardiovascular disease) (A) i z CVD (B). Na podstawie niskich wartości HR_{index} zidentyfikowano pacjentów z cukrzycą typu 2 i ryzykiem związanym z wystąpieniem CVD. Zaobserwowano jednak, że 5 pacjentów z grupy A uzyskało wartości HR_{index} w granicach 12,7% - 18,4% (typowe dla osób

zdrowych) pomimo długiego czasu trwania choroby. Wysłunięto hipotezę, że wartości te są typowe dla osób zdrowych, a ryzyko CVD wydaje się niskie. W pracy podkreślono, że konieczne jest rozszerzenie badania, m. in. o test FMSF-HS, który można by wykorzystać do identyfikacji pacjentów z cukrzycą typu 2 o niskiej wrażliwości na niedotlenienie, a tym samym odpowiednio kwalifikować ich do grupy ryzyka.

W podsumowaniu uzyskanych wyników badań kandydatka do tytułu doktora nauk medycznych stwierdziła, że u pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej z niskimi wartościami HS częściej występowały powikłania sercowo-naczyniowe, mieli oni też gorsze rokowanie co do wygojenia stopy cukrzycowej, parametr ten wykazał też znamienne korelację z wynikami badania USG Doppler naczyń kończyn dolnych, co wskazuje na większą dysfunkcję układu krążenia u tych pacjentów, zarówno w zakresie makro-, jak też mikrokrążenia. Parametry FMSF, RHR i $\log(\text{HS})$ wykazały istotną statystycznie korelację z parametrami funkcji nerek, a także z poziomem AGEs. Parametr HR_{index} u osób z cukrzycą typu 1 był znamienne niższy w porównaniu z osobami zdrowymi i pacjentami z cukrzycą bez powikłań. Parametr ten był też znamienne niższy u chorych z cukrzycą typu 2 z powikłaniami sercowo-naczyniowymi niż u pacjentów bez powikłań i u osób zdrowych.

Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność

W cukrzycy, niezależnie od jej typu, obserwuje się podwyższone ryzyko powikłań na tle zaburzeń mikro-, jak też makrokrążenia. Choroby sercowo-naczyniowe (zawał serca, udar mózgu), czy przewlekła choroba nerek występują w populacji chorych na cukrzycę istotnie częściej niż u równolatków bez cukrzycy. Osoby z cukrzycą często rozwijają też zespół stopy cukrzycowej, który jest istotną przyczyną inwalidztwa i generuje bardzo wysokie koszty dla systemu opieki zdrowotnej. Stąd poszukiwanie metod badawczych, które identyfikują osoby o wysokim ryzyku tych powikłań, jest jak najbardziej interesującą, a przy tym oryginalną tematyką badawczą.

Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Wyniki badań przedstawione przez kandydatkę do tytułu doktora nauk medycznych w pracach oryginalnych wskazują, że metoda Flow Mediated Skin Fluorescence jako technika nieinwazyjna, dostępna i łatwa w wykonaniu, jest obiecującym narzędziem diagnostycznym, które może być stosowane u pacjentów z cukrzycą, jak również z innymi schorzeniami. Upośredzoną odpowiedź na hipoksję wywołaną przemijającym niedokrwieniem można

wykorzystać do różnicowania zespołu stopy cukrzycowej i identyfikacji przypadków o niskim rokowaniu na wyleczenie. Technika FMSF pozwala też na identyfikację upośledzenia funkcji mikrokrążenia u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek, jak również identyfikuje pacjentów z cukrzycą typu 2 z ryzykiem związanym z chorobami sercowo-naczyniowymi. Oczywiście uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia w badaniach na większych kohortach pacjentów w celu potwierdzenia przydatności tej metody do wczesnej diagnostyki zmian naczyniowych i kwalifikacji pacjentów bez klinicznie jawnych powikłań naczyniowych do dalszej interwencji diagnostycznej lub terapeutycznej, która umożliwiłaby podjęcie działań prewencyjnych.

Poprawność językowo-stylistyczna

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem, bez błędów stylistycznych, czy interpunkcyjnych. Również pod innymi względami formalnymi napisana jest dobrze, chociaż zdarzają się drobne uchybienia, np. pacjenci uczestniczący w badaniu są opisani jako grupa „badawcza” zamiast „badana”, niemniej, wyłączając drobne błędy, nie mam większych zastrzeżeń do strony formalno-lingwistycznej dysertacji doktorskiej.

II. Ocena metodologiczna pracy

Prace będące podstawą postępowania o nadanie tytułu doktora nauk medycznych tworzą spójną tematycznie całość prezentując w pracy pogłądowej teoretyczne podstawy dla przeprowadzonych i opublikowanych później wyników badań oryginalnych. Wykaz tych prac jest umieszczony na stronach 7. i 8. rozprawy. Łączny impact factor (IF) prac, w których lek. Agnieszka Łoś-Stegienta jest pierwszym autorem wynosi 3,750, a ilość punktów MEiN 170. Łączny IF wszystkich prac wynosi 6,48, a punktacja MEiN 245.

Układ pracy nie odbiega od standardów przewidzianych dla dysertacji doktorskich. Po stronie tytułowej następują podziękowania dla Promotorki, współautorów i rodziny, a po nich umieszczony jest spis treści, wykaz stosowanych skrótów (strony 4-6), a po nim wykaz prac wchodzących w skład cyklu (strony 7-8).

Na kolejnych stronach znajdują się: streszczenie w języku polskim (strony 9-11) i angielskim (strony 12-14). Wstęp (rozdział 4) jest podzielony na pięć podrozdziałów. Pierwszy z nich – wprowadzenie – definiuje cukrzycę, a także najistotniejsze jej powikłania. Drugi i trzeci opisują etiopatogenezę odpowiednio mikro- i makroangiopatii cukrzycowej. Kolejny opisuje budowę i rolę śródbłonka naczyniowego oraz jego dysfunkcję związaną z

cukrzycą. Podrozdział piąty poświęcony jest opisowi zastosowanej metody Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) z przedstawieniem przykładowych zapisów. Rozdział piąty jest przedstawieniem celu pracy. Rozdział szósty opisuje materiał i metodykę badań, opisuje też wartości progowe i zakresy parametrów ocenianych badaniem FMSF. Rozdział siódmy stanowi omówienie publikacji wchodzących w skład cyklu, jest też prezentacją i omówieniem wyników badań uzyskanych w pracach oryginalnych. Rozdział ósmy jest przedstawionym w punktach podsumowaniem tych wyników, a rozdział dziewiąty prezentuje wnioski Autorki Rozprawy, które są zgodne z uzyskanymi wynikami i zawierają też perspektywy dalszych badań nad użytecznością metody FMSF.

Kolejne rozdziały zawierają: wykaz literatury odnoszącej się do tematyki cyklu prac (49 pozycji) oraz spis tabel i rycin.

Podsumowując, układ pracy i struktura podziału treści są prawidłowe, sformułowane cele badawcze, dobór metod i narzędzi badawczych, jak też ich zastosowanie nie budzi zastrzeżeń, wyniki są przedstawione i omówione w sposób logiczny i spójny, i podsumowane są wnioskami zgodnymi z uzyskanymi wynikami.

III. Ocena dorobku

Lek. Agnieszka Łoś-Stegienta wykazuje się dociekliwością i aktywnością badawczą. Jak dotychczas, sądząc po dotychczasowym dorobku naukowym, jej głównym polem zainteresowań badawczych jest ocena przydatności metody Flow Mediated Skin Fluorescence w ocenie funkcji mikro- i makrokrążenia u osób z cukrzycą typu 1 i 2. i perspektyw jej zastosowania w identyfikacji pacjentów zagrożonych rozwojem tych powikłań u pacjentów bez jawnych ich objawów.

IV. Wniosek końcowy

Wartość naukową Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. Agnieszki Łoś-Stegienty oceniam bardzo wysoko. Przedstawione prace nie budzą wątpliwości co do ich wartości naukowej, Autorka podejmuje przy tym bardzo interesujący i perspektywiczny temat badawczy, który może zaowocować kolejnymi publikacjami.

Kandydatka na stopień doktora nauk medycznych wykazała się przy tym wysokimi umiejętnościami w prezentacji tematyki Rozprawy. W sposób jasny i precyzyjny nakreśliła

tło, zakres tematyczny, hipotezy badawcze i cele przeprowadzonych badań. Prawidłowo też przeprowadziła omówienie ich wyników w nawiązaniu do innych pozycji piśmiennictwa, podsumowując swoje prace i uzyskane wyniki krytyczną ich analizą i wnioskami zgodnymi z uzyskanymi wynikami.

W podsumowaniu stwierdzam, że Rozprawa doktorska pt: „Ocena stanu śródbłonna naczyniowego, przy użyciu innowacyjnej metody – Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF), opartej o fluorescencję NADH, w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach krwionośnych, u osób zdrowych i pacjentów z długotrwałą cukrzycą” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Doktorantka opanowała metody badawcze wykorzystane w przedstawionych pracach i wykazała, że posiada wiedzę teoretyczną i specjalistyczną w wymaganym zakresie, a praca stanowi oryginalne podejście do problemu naukowego. W związku z powyższym zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Agnieszki Łoś-Stegienty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z ważkością podjętej tematyki badawczej, jak też wysoką jej wartością naukową, wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej Rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Łoś-Stegienty.

Dr hab. n. med. lek. Mariusz Dąbrowski
profesor UR
Specjalista chorób wewnętrznych i diabetologii
Nr. PWZ 2282228 tel. +48 604 211 824

Dr hab. n. med. Mariusz Dąbrowski, prof. UR