

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. med. **Anny Słowikowskiej** pt. **„Analiza profilu metabolicznego surowicy pacjentów z wielonaczyniową chorobą wieńcową oraz pacjentów z ciężką stenozą zastawki aortalnej bez zmian w tętnicach wieńcowych”**

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy dla rozprawy doktorskiej układ i zawiera następujące części: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie, ograniczenia pracy i wnioski. Rozprawa liczy 89 stron, zawiera 120 pozycji piśmiennictwa, 15 rycin, 7 tabel, 2 fotografie, co stanowi materiał adekwatny do zakresu poruszanych w pracy zagadnień. Praca przygotowana jest przejrzysto i nowocześnie – użyta w niej poprawna polszczyzna ułatwia lekturę, zrozumienie i analizę interesujących danych uzyskanych przez Autorkę.

Tematem rozprawy jest **Analiza profilu metabolicznego surowicy pacjentów z wielonaczyniową chorobą wieńcową oraz pacjentów z ciężką stenozą zastawki aortalnej bez zmian w tętnicach wieńcowych**. Temat jest niezwykle ciekawy, ponieważ dotyczy nowej metody, metabolomiki, wykorzystywanej do oceny powszechnie występujących schorzeń, takich jak choroba wieńcowa i stenoza zastawki aortalnej.

W ostatnich dekadach występowanie stenozy aortalnej wzrasta w populacji zachodniej, co jest prawdopodobnie związane z procesem postępującego zwiększania długości życia. Ciężka stenoza aortalna (CSA) jest jedną z najcięższych chorób prowadzących do rozwoju niewydolności krążenia i nagłych zgonów sercowych. W praktyce klinicznej duża część chorych z ciężką stenozą aortalną ma objawy kliniczne ograniczone do duszności wysiłkowej czy bólów w klatce piersiowej. Nawet grupa chorych całkowicie bezobjawowa jest również narażona na nagły zgon sercowy. W diagnostyce, ocenie rokowania i wybraniu właściwego terminu wymiany zastawki od lat szuka się dodatkowych metod oceny ryzyka rozwoju CSA, takich jak próba wysiłkowa, ocena zwapnień w tomografii komputerowej czy analiza biomarkerów metabolicznych.

Wprowadzenie nowych, ultraczułych sposobów badania markerów, które pozwolą na zidentyfikowanie grupy o potencjalnie niekorzystnym przebiegu klinicznym, szczególnie we wczesnym okresie, w trakcie hospitalizacji, jest niezwykle ważne. Obecnie stosowane metody identyfikacji wyżej wymienionych chorych, jak oznaczanie peptydów natriuretycznych (głównie BNP), kopektyny, tumor necrosis factor-alpha czy C-reaktywnej proteiny są niedoskonałe.

Drugim badanym tematem podjętym w rozprawie doktorskiej jest metabolomika miażdżycy, która to choroba należy do jednej z najbardziej rozpowszechnionych chorób układu sercowo-naczyniowego, bardzo często dotykającej tętnic serca i mózgu. Jest to choroba, która rozwija się powoli od dzieciństwa do starości i jest przyczyną zwiększonej chorobowości oraz śmiertelności zarówno nagłej, jak i w następstwie komplikacji oraz dysfunkcji różnych narządów, u podstawy których leży miażdżyca. Długi, niemy klinicznie czas rozwoju miażdżycy pozwala na zastosowanie metod metabolomicznych do oceny postępu tej choroby. Znamy wiele czynników ryzyka rozwoju miażdżycy, tj. hypercholesterolemia, palenie tytoniu, cukrzyca, nadciśnienie, wiek, płeć męska, przewlekłe procesy zapalne, wywiad rodzinny i wiele innych. Rozwój miażdżycy jest złożonym procesem chorobowym obejmującym podnabłonkową akumulację lipoprotein w naczyniach tętniczych z następowym ich składowaniem w przestrzeni międzykomórkowej. Proces ten prowadzi do pobudzenia komórek zapalnych i zaktywizowania systemu immunologicznego, komórek mięśni gładkich, immunoglobulin, komórek nekrotycznych i wielu innych procesów, w rezultacie których powstaje blaszka miażdżycowa.

Zatem możliwość dodania nowych oznaczeń markerów, metabolomiki, zwiększających wartość prognostyczną może stanowić niezwykle ważne zagadnienie kliniczne.

Dodatkowo, również ze względu na wspólne mechanizmy rozwoju miażdżycy i stenozы aortalnej, wyniki tej pracy mogą mieć następowe implikacje kliniczne i terapeutyczne. Najnowsze badania pokazują, że zwapnienie zastawki aortalnej nie może być dłużej rozpatrywane jako pasywny proces odkładania się depozytów wapnia w wieku podeszłym. Biomineralizacja zastawki jest wywołana przez szereg mechanizmów, począwszy od czynników genetycznych, biochemicznych i mechanicznych a kończąc na krążących w krwioobiegu makrofagach i komórkach szpiku. Ważną rolę odgrywają tutaj procesy zapalne, metaboliczne czynniki ryzyka oraz molekularne i komórkowe

mechanizmy nasilające zwapnienie.

Współczesne rozpoznanie i leczenie ciężkiej stenozы aortalnej i zaawansowanej miażdżycy to trudny i złożony problem kliniczny, ponieważ zazwyczaj w pierwszym okresie rozwoju choroby wywołuje niecharakterystyczne objawy, a nawet może przebiegać bezobjawowo. We wczesnej diagnostyce bierze się pod uwagę ocenę stanu klinicznego, wyniki badań obrazowych (echokardiografia, CT, MRI) i laboratoryjnych (troponina, BNP).

W piśmiennictwie istnieją nieliczne publikacje na temat nowych obiektywnych metod selekcji pacjentów o wysokim ryzyku rozwoju niewydolności krążenia czy zagrożenia nagłym zgonem sercowym w przypadku CSA. Brakuje natomiast publikacji dotyczących badań nad zależnością między stopniem rozwoju miażdżycy u chorych ze stenozą aortalną i skutkami klinicznymi oraz wyznaczeniem wczesnego etapu rozwoju/współistnienia tych chorób, na którym istniałaby możliwość zastosowania leczenia farmakologicznego.

Dlatego też temat pracy lek. med. **Anny Słowikowskiej** należy uznać za poznawczo i twórczo istotny.

Tytuł pracy właściwie odzwierciedla treść rozprawy.

We **Wstępie** Autorka zapoznaje czytelnika z epidemiologią zwężenia zastawki aortalnej oraz omawia mechanizmy degeneracyjne, miażdżycowe, morfologiczne i hemodynamiczne prowadzące do zwężenia zastawki aortalnej. Opisuje miejsce echokardiografii w ocenie stenozы aortalnej, a także przedstawia wpływ czynników genetycznych na jej rozwój.

Następnie omawia podział stenozы aortalnej na cztery kategorie. W sposób przystępny, dydaktyczny i przemyślany opisuje czynniki kwalifikujące do tych kategorii.

Dużą część wstępu Doktorantka poświęca omówieniu powiązania miażdżycy ze stenozą aortalną oraz ocenie lipoprotein i leczenia statynami na progresję zmian w zastawce aortalnej. Dalej Autorka przedstawia nową metodę diagnostyczną – metabolomikę i narzędzia służące do oceny metabolomu. Wstęp jest obszerny i bardzo dobrze opracowany pod względem merytorycznym – stanowi wartościowy element rozprawy, a zarazem użyteczne wprowadzenie do poruszanych w pracy zagadnień. Na 48 stronach

Autorka dokumentuje głęboką znajomość piśmiennictwa naukowego i orientację w zagadnieniach związanych z rolą dziedzin „omicznych” łączących ze sobą obszary nauki i technologii (tu Doktorantka załącza bardzo pomocne informacje o metabolomice i opis narzędzi używanych w określaniu metabolomu) oraz zamieszcza schemat procesu diagnostyczno-terapeutycznego w przyszłości.

Cel badania został przedstawiony jednoznacznie, a jego precyzyjny wybór jest wyczerpująco przedyskutowany i dobrze uzasadniony, zarówno pod względem poznawczym, jak i w aspekcie praktycznym analizowanego problemu. Doktorantka opracowała dwie hipotezy badawcze.

Materiał badania jest prawidłowo dobrany. Grupę badaną stanowiło 60 chorych (30 pacjentów z ciężką stenozą aortalną bez zmian w tętnicach wieńcowych i 30 z zaawansowaną chorobą wieńcową) – średnia wieku $65,7 \pm 2,1$ lat, hospitalizowanych w Klinice Kardiochirurgii I Katedry i Kliniki Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego lub w Klinice Kardiologii we współpracy z Kliniką Kardiochirurgii. Opisy kryteriów włączenia i wykluczenia chorych do badania oraz wykonywania czynności diagnostycznych są wyczerpujące.

Metody badania opisane zostały bardzo dokładnie i przejrzysto, właściwie dla osiągnięcia zaplanowanego celu pracy. Na podkreślenie zasługuje dobranie grupy chorych z wyłączeniem cukrzycy, chorób tarczycy i przewlekłych chorób zapalnych tak, aby model miażdżycy w naczyniach wieńcowych był niezakłócony.

Zwraca uwagę dokładność zaplanowanego badania, tzn. surowice wszystkich pacjentów zamrażano w -80 stopniach Celsjusza, a analizy dokonywano w Środowiskowym Laboratorium NMR w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, co świadczy między innymi o tym, że Autorka ma świadomość potencjalnych ograniczeń prac naukowych.

Opis analizy statystycznej, zarówno zmiennych ciągłych w rozkładzie normalnym, jak i innym niż normalny, jest prawidłowy i nowoczesny, co dowodzi opanowania przez Doktorantkę właściwych metod analitycznych.

Wyniki badań stanowią o dużej wartości poznawczej rozprawy. Są opisane klarownym językiem. Istotne dane zestawiono w przejrzystych 10 tabelach oraz adekwatnych 7 rycinach. Należy podkreślić niezwykłą dokładność i rzetelność analizy oraz umiejętność

kwalifikacji amplitud sygnałów widm NMR. Analiza widm NMR związków lipidowych wykazała, że amplitudy sygnałów pochodzących od: sfingomieliny, fosfatydylocholiny, całkowitego cholesterolu, większości wolnych kwasów tłuszczowych, większości cholesterolu zestryfikowanych, latosterolu i kwasów w-6 są większe w grupie AS niż w grupie CHD. Natomiast amplitudy sygnałów pochodzących od 7-ketocholesterolu i 25-hydroksycholesterolu są większe w grupie CHD niż AS. Analiza wszystkich danych testem wieloparametrycznym ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacji (OPLS-DA) pozwoliła Autorce na zbudowanie wiarygodnego modelu składającego się z dwóch komponentów – jednego predykcyjnego i jednego ortogonalnego. Chorzy zostali w 83% prawidłowo zakwalifikowani do swoich grup. W przypadku mężczyzn Doktorantce udało się stworzyć wiarygodny model uzyskując wartości $R^2=0,72$ i $Q^2=0,249$.

Dyskusja stanowi klarowną prezentację wyników pracy Doktorantki. Autorka stwierdziła, że pomimo podobnego stężenia cholesterolu i jego frakcji określanych konwencjonalnie, grupy pacjentów z ciężką stenozą aortalną bez zmian w tętnicach wieńcowych i z zaawansowaną chorobą wieńcową różnią się istotnie statystycznie profilami lipidowymi oznaczonymi metodą spektroskopii NMR.

Z uzyskanych danych wynika, iż pomiędzy dwiema grupami pacjentów określone lipoproteiny różnią się zawartością poszczególnych związków lipidowych o małej masie cząsteczkowej. Uwzględnienie tej różnicy może mieć zupełnie inny wpływ na powstanie zmian w tętnicach wieńcowych lub płatkach zastawki aortalnej.

Autorka dowodzi doskonałej znajomości literatury dostępnej w badanym zakresie i umiejętności jej krytycznej analizy w zestawieniu z wynikami własnymi. Dyskusja stanowi bardzo wartościową część tej rozprawy, zaś podrozdział dotyczący ograniczeń pracy świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Ograniczenia pracy odzwierciedlają rzetelność naukową Autorki, która w celu eliminacji dodatkowych czynników rozwoju miażdżycy wyłączyła z badania chorych m.in. z cukrzycą, chorobami tkanki łącznej i tarczycy. Doktorantka podkreśla małą liczebność kobiet w grupach badanych, która wynika z epidemiologii oraz akcentuje brak dokładnych danych o historii przyjmowanych statyn. Wskazuje, że przyjmowanie statyn nie było wystarczająco dokumentowane przez lekarzy prowadzących i pacjentów.

Wnioski stanowią poprawne zamknięcie całości wyводу. Zawierają one najistotniejsze implikacje wykonanych badań:

1. Wyniki badań mogą wskazywać na różne patomechanizmy obydwu schorzeń.
2. Metoda spektrometrii NMR pozwala na rozróżnienie obydwu grup chorych, przy czym wydaje się, że u części chorych ze stenozą aortalną profil metaboliczny wskazuje na możliwość wystąpienia w przyszłości incydentu wieńcowego.
3. Praca wskazuje nowe kierunki dalszych badań nad możliwością wykrywania stenozы aortalnej we wczesnym stadium.

Wnioski ww. są istotnym głosem w dyskusji.

Streszczenia w języku polskim i angielskim prawidłowo podsumowują najważniejsze aspekty rozprawy.

Wykaz stosowanych skrótów zamieszczony w porządku alfabetycznym na początku pracy ułatwia jej lekturę, pozwalając na szybką orientację w terminologii używanej przez Doktorantkę.

Piśmiennictwo jest niezwykle obszerne i właściwie wybrane, a jego dobór potwierdza bardzo dobrą znajomość dostępnej literatury z zakresu tematyki rozprawy.

W pracy występują drobne, pojedyncze usterki (np. nie wszystkie skróty użyte w pracy znajdują się w wykazie, co ułatwiłoby jej czytanie). W dyskusji i ograniczeniach powinno się uwzględnić zmiany miażdżycowe występujące w innych obszarach niż tylko w naczyniach wieńcowych. Przy publikacji wyników badań trzeba uwzględnić inne lokalizacje zmian miażdżycowych, gdyż mogą one wpływać na wyniki badań NMR.

- Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny **pracy doktorskiej lek. med. Anny Słowikowskiej.**

Podsumowując, stwierdzam że przedstawiona mi do recenzji rozprawa stanowi oryginalne dokonanie Doktorantki i świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu pracy naukowej, oczekiwanym od kandydatki na stopień doktora nauk medycznych.

W mojej ocenie rozprawa lek. **Anny Słowikowskiej** z pewnością spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. zm.) stawiane analogicznym pracom. W związku z tym proszę Wysoką Radę Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie jej Autorki do dalszych części przewodu doktorskiego.

Warszawa, 2019/03/05

Prof. nadzw. dr. hab. n. med.
Robert Olszewski
Specjalista Chorób Wewnętrznych
KARDIOLOG
nr 1711607