

prof. dr hab. n. med. Rafał Dąbrowski
Narodowy Instytut Kardiologii im. Stefana kardynała Wyszyńskiego PIB
w Warszawie

**Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk
o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne
lek. Soni Borodzicz-Jażdżyk**

**Analiza echokardiograficzna w szczurzym modelu
uszkodzenia serca indukowanego isoprenaliną**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska
Promotor pomocniczy: dr n. med. Katarzyna Czarzasta

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2021r.

Uwagi ogólne

Tematyka ujęta w pracy jest interesująca, biorąc pod uwagę hipotezy dotyczące mechanizmów i warunków wystąpienia uszkodzenia lewej komory serca. Ma to praktyczne znaczenie, ponieważ właściwa interpretacja wyników badań i ustalenie tła patofizjologicznego wpływa na podjęcie rodzaju leczenia. Dlatego problemy będące przedmiotem obecnej dysertacji są istotne, właściwie wybrane, ale też trudne i złożone. Pomimo eksperymentalnego charakteru praca ma znaczenie interdyscyplinarne i obejmuje zagadnienia z pogranicza kardiologii, endokrynologii oraz diagnostyki obrazowej i biochemicznej. Rozprawa liczy 130 stron, zawiera 22 tabele i 27 rycin. Wykorzystano 118 pozycji piśmiennictwa autorów polskich i zagranicznych. Struktura dysertacji jest typowa. Zwraca uwagę bardzo staranna edycja pracy, wolna od błędów korektorskich, co dotyczy samego tekstu, ale także tabel i rycin. Praca jest napisana konkretnym, ścisłym językiem, bardzo odpowiednim dla prac naukowych.

Wstęp

Wstęp liczy 14 stron. Doktorantka w pierwszej części Wstępu przybliży problematykę uszkodzenia mięśnia sercowego uwzględniając mechanizmy patofizjologiczne, epidemiologię, metody diagnostyczne. Szczególnie skupia się na klinicznym zespole Takotsubo oraz roli isoprenaliny jako narzędzia uszkodzenia mięśnia serca w modelach zwierzęcych. Odrębnym poruszonym zagadnieniem jest rola estrogenów w chorobach sercowo-naczyniowych. Wydaje się, że można by bardziej rozdzielić kwestię miażdżycowego tła choroby wieńcowej, także z uwzględnieniem roli estrogenów (str. 41), od uszkodzenia z innych przyczyn, w tym w przebiegu zespołu Takotsubo. Kobiety po menopauzie są istotnie częściej narażone na epizody sercowo-

naczyniowe z powodu zmian miażdżycowych, niż z innych przyczyn. Zespół Takotsubo jest stosunkowo rzadkim i złożonym zespołem klinicznym. Jest to swoista osobliwość kardiologiczna. Często jest jego nadrozpoznawalność, co widać w dokumentacji klinicznej leczonych pacjentów, pomimo prób ustalenia precyzyjnych kryteriów klinicznych. Natomiast doniesienia na temat roli estrogenów w występowaniu tej formy kardiomiopatii stresowej, są, jak wskazuje Autorka obecnej rozprawy na podstawie piśmiennictwa dotyczącego tematu - sprzeczne. Nie wiadomo też, jak dalece można utożsamiać sytuację kliniczną z modelami eksperymentalnymi tej choroby uwzględniającymi isoprenalinę czy inne aminy katecholowe jako czynniki uszkodzające mięsień sercowy.

W kolejnej części Wstępu Doktorantka opisuje rolę echokardiografii jako metody obrazującej strukturę i czynność serca w badaniach eksperymentalnych.

Wstęp dysertacji jest napisany dojrzałe i może stanowić rozdział do podręcznika poświęconego tej tematyce. Tekst Wstępu został zilustrowany 1 tabelą i 1 ryciną.

Założenia i Cele pracy

Przeprowadzone badania miały odpowiedzieć na pytania: czy i w jaki sposób obniżony poziom żeńskich hormonów płciowych może wpływać na indukowane katecholaminami uszkodzenie mięśnia sercowego. Biorąc pod uwagę tytuł dysertacji „Analiza echokardiograficzna w szczurzym modelu uszkodzenia serca indukowanego isoprenalina” warto byłoby w Założeniach pracy odnieść się też do roli modeli uszkodzenia mięśnia serca i echokardiografii. W celu realizacji wyznaczonych zadań przyjęto jeden główny i 7 szczegółowych celów pracy.

Cel główny

Głównym celem rozprawy była ocena przydatności echokardiografii w diagnostyce, ocenie zaawansowania i przebiegu uszkodzenia mięśnia sercowego indukowanego dootrzewnową iniekcją isoprenaliny u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii lub operacji pozorowanej.

Cele szczegółowe

- 1) Ocena wymiarów i funkcji skurczowej LV u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii i operacji pozorowanej po 6, 12, 24, 72 godzinach i 10 dniach od iniekcji ISO lub roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl);
- 2) Ocena funkcji rozkurczowej LV u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii i operacji pozorowanej po 6, 12, 24, 72 godzinach i 10 dniach od iniekcji ISO lub 0,9% NaCl;
- 3) Ocena średnicy pierścienia zastawki aortalnej i parametrów przepływu przez zastawkę aortalną u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii i operacji pozorowanej po 6, 12, 24, 72 godzinach i 10 dniach od iniekcji ISO lub 0,9% NaCl;
- 4) Ocena funkcji skurczowej prawej komory serca i parametrów przepływu przez pień płucny u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii i operacji pozorowanej po 6, 12, 24, 72 godzinach i 10 dniach od iniekcji ISO lub 0,9% NaCl;
- 5) Ocena osoczowego stężenia TnI u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii i operacji pozorowanej po 6, 12, 24, 72 godzinach i 10 dniach od iniekcji ISO oraz 24 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl;

- 6) Ocena osoczowego stężenia N-końcowego propeptydu natriuretycznego typu B (*ang. N-terminal pro B-type natriuretic peptide*; NT-proBNP) u samic szczurów Sprague Dawley poddanych ovariectomii i operacji pozorowanej po 6, 12, 24, 72 godzinach i 10 dniach od iniekcji ISO oraz 24 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl;
- 7) Histopatologiczne potwierdzenie uszkodzenia mięśnia sercowego indukowanego ISO

Cele pracy są spójne, zostały przedstawione właściwie, co pozwoliło na szeroką analizę całości materiału zebranego w toku pracy badawczej. Wskazują na wielowątkową analizę badanych zagadnień. Przyjęto ambitny cel główny dotyczący echokardiografii oraz liczne cele szczegółowe z uwzględnieniem badań biomarkerów martwicy i niewydolności serca oraz badań histopatologicznych.

Materiał i metody

Doktorantka opisuje szczegółowo metodologię wykonywanych badań (str.47-63). Należy podkreślić bardzo duży wkład pracy w przeprowadzenie badań - Autorka pracy samodzielnie przeprowadzała badania, pomiary i analizy wyników. W tabelach przedstawiono szczegółowo charakterystykę grup i serii doświadczalnych. Przyjęte założenia pracy i metodykę uważam za właściwe. Zaletą pracy jest zastosowanie szerokiego spektrum metod badawczych. Doświadczenie i renoma Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a także znaczący dorobek naukowy i profesjonalny Promotora pracy doktorskiej, Pani Prof. Agnieszki Cudnoch-Jędrzejewskiej gwarantowały właściwe przeprowadzenie badań.

Wyniki

Przedstawiono dużą ilość danych, porównań i analiz związanych z przedstawionymi celami pracy. Wyniki zaprezentowano bardzo szczegółowo (str.63-109) przy użyciu 19 tabel i 19 rycin. Można mieć ogólną uwagę, że przedstawienie w tekście wartości wyników badań jest mało czytelne (np. strony: 67, 68, 82, 84). Wyniki znalazły odbicie we Wnioskach. Dalsze uwagi dotyczące oceny wyników i ich prezentacji przedstawiono w akapicie Uwagi recenzenta.

Dyskusja

W Dyskusji (str.110-122) Doktorantka omówiła wyniki badań własnych odnosząc się do opublikowanych dotychczas doniesień na tematy związane z pracą z obszaru nauki polskiej i światowej. Sposób prowadzenia dyskusji, oparty o właściwie dobrane cytowania prac, świadczy o dużej znajomości literatury przedmiotu i poglądów dotyczących zagadnień poruszanych w pracy oraz o obiektywnej analizie uzyskanych wyników i właściwej ich interpretacji. Doktorantka przedstawiła przy tej okazji własne przemyślenia i uwagi. Autorka jest świadoma ograniczeń przeprowadzonych badań, co przedstawiła w osobnym akapicie. Doktorantka ma zdolność formułowania pytań generujących hipotezy badawcze. Bibliografia obejmuje 118 pozycji z uwzględnieniem prac polskich autorów.

Wnioski

Podsumowaniem pracy jest 10 wniosków mających znaczenie praktyczne i naukowe. Przynoszą one ważne, według recenzenta, informacje:

- 1) Szczury z grupy ISOO wykazują większe wymiary lewej komory serca, w tym LVEDA i LVEDD, co wskazuje na zaawansowane przeciążenie objętościowe i rozstrzeń lewej komory.
- 2) Szczury z grupy ISOO mają istotnie wyższe FAC, przy jednoczesnym zwiększeniu LVEDA i zmniejszeniu LVESA, co sugeruje większą siłę skurczu mięśnia sercowego.
- 3) Szczury z grupy ISOO wykazują istotnie niższe wartości AcT, co wskazuje na wyższe ciśnienie i opór w łożysku płucnym.
- 4) FAC jest parametrycznym wskaźnikiem funkcji skurczowej lewej komory serca, wyróżniającym zwierzęta z klinicznie jawnym TTS (TTSO-o) od zwierząt z serii bISOO-o otrzymujących iniekcję ISO, nie rozwijających odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory.
- 5) Nekroptoza może brać udział w uszkodzeniu serca indukowanym ISO, w tym TTS.
- 6) Istotnie niższe stężenie TnI u szczurów z grupy ISOO w porównaniu do grupy ISOP może wynikać z zaburzonej dystrybucji Tn w obrębie serca przez masywny obrzęk międzykomórkowy występujący u zwierząt poddanych owariektomii oraz z przewagi programowanych rodzajów śmierci komórkowej, w tym nekroptozy.
- 7) Szczury z grupy ISOO mają istotnie wyższe osoczowe stężenie NT-proBNP, co w połączeniu z większymi wymiarami lewej komory serca sugeruje wzrost przeciążenia i wystąpienie ostrej niewydolności lewej komory.
- 8) Histopatologiczne cechy TTS obserwowane były również u zwierząt, u których nie obserwowano odcinkowych zaburzeń kurczliwości w badaniu echokardiograficznym, co sugeruje, iż zasadne wydaje się wyodrębnienie subklinicznej formy TTS.

9) Histopatologiczne cechy TTS występowały u samic szczurów poddanych ovariectomii i operacji pozorowanej otrzymujących iniekcję ISO, co sugeruje, iż hipoestrogenemia może nie być czynnikiem odgrywającym główną rolę w patofizjologii TTS.

10) TTS wykazuje piorunujący przebieg u samic szczurów poddanych ovariectomii, w odróżnieniu od samic szczurów poddanych operacji pozorowanej.

Wnioski są konsekwencją wyników pracy. Mają dużą wartość naukową i praktyczną obejmującą aspekty diagnostyczne i patofizjologiczne.

Uwagi recenzenta, w tym dotyczące opracowania wyników

1. Metodyka echokardiograficzna

- w ocenie funkcji rozkurczowej LK można było wykorzystać funkcję doplera

tkankowego

- do oceny funkcji skurczowej LK zastosowano tylko procentową zmianę pola powierzchni lewej komory serca, *ang. fractional area change, FAC*, można by było jeszcze rozważyć inne parametry: frakcję wyrzutową lewej komory (LVEF), prędkość skurczową pierścienia mitralnego(s'), amplitudę ruchu pierścienia zastawki mitralnej (MAPSE) czy tempo narastania ciśnienia w czasie (dP/dt).

- porównując czasy akceleracji i deceleracji należy zwrócić uwagę czy częstość serca była porównywalna w badanych grupach, ponieważ może to mieć wpływ na czas akceleracji przepływu przez zastawkę pnia płucnego (im wyższe HR, tym krótsze Act).

2. Dlaczego stężenie NT-proBNP jest wyższe w grupie kontrolnej niż z uszkodzeniem mięśnia sercowego i Takotsubo? (tabela 12, str. 87).

3. Zwraca uwagę brak schematu badawczego, nie podawanie dokładnych liczebności podgrup oraz skomplikowane skróty, co utrudnia zrozumienie pracy. Nazwy grup mogłyby być prostsze. Na schemacie można by przedstawić:

1) Liczbę osobników operowanych N1.

2) Liczbę osobników poddanych zabiegowi pozorowanemu.

3) Liczbę osobników z uszkodzeniem mięśnia serca; w grupie operowanej i w grupie z zabiegiem pozorowanym.

4) Liczbę osobników, którym podano sól fizjologiczną w grupie operowanej i w grupie z zabiegiem pozorowanym. I w każdej z tych czterech podgrup liczebność.

4. Brak wnioskowania na temat liczebności - porównania np. frakcji Takotsubo w obu grupach. Nie określono odsetka, u ilu osobników wystąpiły zaburzenia kurczliwości, a u ilu nie wystąpiły.

5. Rycina 2, str.46: co przedstawia liczebność „n” w poszczególnych dniach?

Ramiona powinny być rozdzielone, jeżeli dokonywano podania ISO lub NaCl. Jaka była liczebność podania ISO w grupie O, a jaka w grupie C? Brakuje określenia liczby osobników pierwszej i drugiej grupy, którym podano ISO i NaCl. Wyliczono to dopiero z następnych tabel. GRUPA O: n=76, w tym ISO: n=? (stanowiąca grupę ISOO) i C: n=? (stanowiąca kontrolę grupa CO). GRUPA P: n=71, w tym ISO: n=? (stanowiąca grupę ISOP) i C: n=? (stanowiąca kontrolę grupa CP). Czy to przypadek że podział na O i P to n=76 i n=71 oraz ISO i C to również n=76, n=71?

6. Zwraca uwagę nie podawanie liczebności w tabelach.

7. Schemat badania zaprezentowany w pracy odpowiada dwuczynnikowej krzyżowej analizie wariancji z powtarzanymi pomiarami. Jeden czynnik: zabieg (owariektomia lub zabieg pozorowany), drugi czynnik : podanie ISO lub NaCl. Wydaje się, że nie

wykonano badania interakcji. Jeżeli nie można było powtarzać badań u tych samych jednostek w każdym punkcie czasowym, to powinna być to dwuczynnikowa krzyżowa analiza wariancji (bez powtórzeń).

8. Rozdział 4.2 – brakuje wnioskowania statystycznego. Nie określono jaki był odsetek zwierząt z zaburzeniami kurczliwości ($10/76=13,2$ oraz $10/71=14,1\%$). Wyniki te wymagają odpowiednich analiz statystycznych, prawdopodobnie byłyby one zapewne nieistotne statystycznie, ale nie dokonano takiego wnioskowania.

9. Rozdział 4.3.1, str.67. Skąd takie liczebności w tabelach? Czy należy rozumieć, że badanie echokardiograficzne nie było wykonywane u wszystkich osobników w każdym czasie pomiarowym? Każdy osobnik miał je wykonane tylko raz? Suma wszystkich obserwacji w tabeli 6 wynosi rzeczywiście 76, w tabeli 7 wynosi 71, podobnie suma isoo i isop=76, coi cp=71.

10. Jaka jest moc testów statystycznych dla tak małych liczebności, czy nie można dokonać analizy na łącznych grupach (połączenie wyników z poszczególnych godzin)?

11. Niezrozumiałe jest, jakich porównań dotyczy wartość istotności statystycznej w tabelach: 10, 11, 12 i 13? Jeżeli wszystkich indywidualnych pomiarów, to istotny wynik wskazywałby na konieczność dokonania porównań wielokrotnych dla każdej pary, albo przynajmniej porównania z grupą kontrolną (czyli powinno być podanych jeszcze minimum 5 wartości p). Podana istotność statystyczna mówi tylko, że wśród analizowanych grup znajduje się przynajmniej jedna para, z istotnie różnymi wartościami średnimi. Nie wskazano jaka to para. Jeżeli dla całej grupy łącznie (ISOO lub ISOOP), to brakuje wartości średniej dla połączonych wyników ISOO i ISOOP.

12. Tabele 14 – 22. Czy nie lepiej byłoby wyniki przedstawić w postaci ilościowej?

Czyli podać liczby osobników, u których występują wymieniane zmiany histopatologiczne? Wyniki w postaci liczebności może mogły być opracowane statystycznie?

Uwagi edytorskie

1. Styl angielskiego tłumaczenia abstraktu mógłby być bardziej odpowiedni dla publikacji naukowych.

2. Wykaz skrótów: **ISOO-o**: samice szczurów Sprague Dawley poddane operacji pozorowanej z indukowanym isoprenalina uszkodzeniem mięśnia sercowego bez odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji isoprenaliny) - powinno być chyba: „poddane owariektomi”?

3. Zdanie: „W typowym wariancie TTS obserwuje się akinezę segmentów koniuszkowych i środkowych z jednoczesną hiperkinezą segmentów koniuszkowych LV.” Powinno być „podstawnych” str.35, 12 linijka od dołu.

4. Zdanie: „W warunkach fizjologicznych SOD przekształca anionorodnik ponadtlenkowy do nadtlenu wodoru i tlenu, natomiast CAD redukuje go do tlenu i wody [33]”. Powinno być „CAT”, str. 36, 6 linijka od dołu.

Podsumowanie recenzji

Temat rozprawy jest aktualny i interesujący w aspekcie poszukiwania modeli eksperymentalnych uszkodzenia mięśnia serca i metod diagnostycznych. Doktorantka podjęła wyzwanie zmierzenia się z tym trudnym, złożonym metodycznie, interdyscyplinarnym problemem badawczym. Oryginalnym wkładem pracy jest, wg

Autorki, na podstawie danych z piśmiennictwa, przedstawienie po raz pierwszy oceny histopatologicznej samic szczurów poddanych owariektomii z indukowanym uszkodzeniem mięśnia serca po podaniu isoprenaliny. Udowodniono, że samice szczurów poddane owariektomii prezentują bardziej zaawansowane zmiany degeneracyjne miokardium w porównaniu do samic płodnych. Odnosząc się do Podsumowania: „Wyniki niniejszego badania wskazują na obecność potwierdzonej histopatologicznie subklinicznej formy TTS bez odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory serca obserwowanych w badaniu echokardiograficznym, co może sugerować ograniczoną przydatność echokardiografii w modelu eksperymentalnym uszkodzenia serca indukowanego ISO.” Można postawić problem inaczej – może model eksperymentalny uszkodzenia serca indukowanego isoprenaliną nie jest do końca adekwatny dla zespołu Takotsubo biorąc pod uwagę wybrany lek, dawkę i czas podawania, a ocena echokardiograficzna powinna być wzbogacona o dodatkowe parametry, co uwzględniono w uwagach. Jest to temat do dalszej dyskusji. Jednak nie umniejsza to wartości pracy. Zawartość dysertacji oraz analiza 118 pozycji piśmiennictwa świadczą o dobrej znajomości poruszanych tematów. Do zrealizowania celów badawczych przyjęto właściwą metodykę. Wyniki zostały opracowane prawidłowo i zaprezentowano je w formie licznych analiz. Wnioski mają charakter naukowy, ale i praktyczny. Praca dostarcza cennych informacji z zakresu analizowanego tematu i przedstawia badaną problematykę w sposób szeroki i wielowymiarowy. Należy podkreślić jej staranną edycję, wolną od błędów korektorskich. Uwagi zawarte w recenzji mają charakter techniczny, zostały przedstawione z obowiązku recenzenta i nie obniżają wartości dysertacji.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarz Soni Borodzicz-Jażdżak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w § 1, zgodnie z przepisami ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U. 2017, poz. 1789). W związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).


prof. dr hab. n. med. Rafal Dabrowski
prof. dr hab. n. med. RAFAL DABROWSKI
specjalista chorób wewnętrznych
SPECJALISTA KARDIOLOG
347462

Warszawa, dnia 07 kwietnia 2021r.