

Dr hab. n. med. Dariusz Kotłęga, prof. UZ

Zielona Góra, dnia 05.06.2023

Zakład Farmakologii i Toksykologii

Uniwersytet Zielonogórski

Collegium Medicum

Ul. Zyty 28

65-046 Zielona Góra

## RECENZJA

Recenzja w postępowaniu doktorskim w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu lek. Natalii Pauli, Centrum Medyczne Nova 5 w Gorzowie Wielkopolskim, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 25.04.2023r. pt.: „Związek osoczowych stężeń PCSK9 i wybranych cytokin z parametrami biochemicznymi, echokardiograficznymi i klinicznymi u pacjentów z chorobą wieńcową rozpoznaną w młodym wieku”.

Doktorantka lek. Natalia Pauli przedstawiła rozprawę doktorską o tytule „Związek osoczowych stężeń PCSK9 i wybranych cytokin z parametrami biochemicznymi, echokardiograficznymi i klinicznymi u pacjentów z chorobą wieńcową rozpoznaną w młodym wieku”. Funkcję promotora pełni Pani prof. dr hab. n. med. Monika Rać.

Tytuł rozprawy doktorskiej stanowiącej podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora został ustalony właściwie, odpowiednio oddaje zawartość merytoryczną, odzwierciedla postawione cele, przeprowadzone badania i zaprezentowane wnioski pracy.

Właściwa część rozprawy doktorskiej przedstawiona została na 59 stronach. W skład pracy wchodzi strona tytułowa, spis treści, wstęp, cel pracy, materiał i metody, omówienie wyników z dyskusją na podstawie cyklu publikacji naukowych, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, piśmiennictwo oraz publikacje, na podstawie których Doktorantka napisała rozprawę doktorską. Układ pracy jest właściwy względem rodzaju rozprawy doktorskiej opartej na cyklu publikacji. Zachowana została odpowiednia kolejność i przejrzystość

prezentowanych tez. W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej nie zostały zawarte części pracy prezentujące wykaz tabel i rycin.

We wstępie rozprawy doktorskiej Doktorantka szczegółowo opisała istotne z punktu widzenia przeprowadzonych badań informacje teoretyczne. Obejmują one charakterystykę choroby wieńcowej, patogenezę miażdżycy, informacje na temat białka PCSK9 (konwertaza pro proteiny subtylizyna/keksyna typu 9). Charakterystyka tego białka przedstawiona została szczegółowo na podstawie i z przytoczeniem publikacji teoretycznej znajdującej się w cyklu prac i której Doktorantka jest autorem (Pauli N., Rać E. PCSK9 – nowe perspektywy farmakoterapii hipolipemizującej u pacjentów z chorobą wieńcową. Farm Pol. 2020, 76 (6): 312-317. Liczba punktów MEiN: 70). W kolejnych częściach wstępu Doktorantka przedstawiła charakterystykę białka VEGF-A (czynnik wzrostu śródbłona naczyniowego) i interleukiny-6. W każdym z ostatnich trzech części wstępu ujęte zostały ryciny, które pomagają lepiej zrozumieć rolę w fizjologii i patologii badanych białek, tj. PCSK9, VEGF-A i Il-6. Doktorantka zastosowała niewłaściwy styl podpisu dwóch rycin, gdyż znajdują się one powyżej rycin. W rycinie drugiej z niewiadomego powodu podpis znajduje się w kolorowym obramowaniu.

Całość wstępu dokładnie przedstawia aspekty teoretyczne poruszanych zagadnień. Poza wyżej wymienionymi drobnymi uwagami, ta część rozprawy doktorskiej została zaprezentowana we właściwy sposób, pozwala czytelnikowi zapoznać się z najważniejszymi zagadnieniami ujętymi w przeprowadzonych badaniach.

Doktorantka przyjęła następujące cele stanowiące podstawę badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej: ocena u pacjentów z chorobą wieńcową rozpoznaną w młodym wieku związku między stężeniem w osoczu białek PCSK9, Il-6 i VEGF-A a obrazem klinicznym, obecnością niektórych znanych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, wybranymi parametrami biochemicznymi, parametrami morfologii serca, jego funkcji skurczowej i rozkurczowej, a także niektórymi radiologicznymi wskaźnikami postępu miażdżycy tętnic szyjnych i układowych.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie z 06.11.2017r. Do badania włączono pacjentów spełniających jedno z trzech kryteriów: przebycie zawału mięśnia sercowego, udokumentowane zwężenie tętnic wieńcowych ( $\geq 40\%$  pnia lewej tętnicy wieńcowej lub  $\geq 50\%$  głównego pnia naczyniowego lub  $\geq 70\%$  gałęzi), przebyty zabieg rewaskularyzacji mięśnia sercowego (CABG lub PTCA). Kryteria wyłączenia były następujące: świeżo przebyty ostry zespół wieńcowy, istotna niewydolność lub wada serca (NYHA  $\geq$  II), ciężka niewydolność nerek (stężenie kreatyniny w surowicy  $> 3\text{mg/dl}$ ), wątroby, cukrzyca typu 1, zaburzenia czynności tarczycy, reumatoidalne zapalenie stawów, choroby nowotworowe.



Okres od przebytego zabiegu rewaskularyzacji lub koronarografii wynosił co najmniej 30 dni. Finalnie do badania zakwalifikowanych zostało 100 kolejnych pacjentów hospitalizowanych w Oddziale Kardiologii Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Szczecinie. 75 osób stanowili mężczyźni w wieku do 50 r. ż, natomiast 25 osób to kobiety w wieku do 55 r. ż. Grupę kontrolną dla badań biochemicznych stanowiło 50 dobranych względem wieku i płci osób. W tabeli nr 1 opisano charakterystykę grupy badanej. W dalszej części tego działu znajdują się metody statystyczne oraz wykonane badania diagnostyczne z metodologią oznaczania białek PCSK9, VEGF-A i II-6 – na podstawie publikacji ujętej w cyklu prac (Dziedziejko V., Pauli N., Kuligowska A., Safranow A., Goschorska M., Chlubek D., Rać M. Significant limitations associated with the analysis of human plasma soluble CD36 performed by ELISA. Pomeranian J. Life Sci. 2018; 64(3): 5-7. Liczba punktów MEiN: 9).

W metodologii nie znajduje się wyjaśnienie co dokładnie oznacza „świeżo przebyty ostry zespół wieńcowy” - jaki przedział czasowy został przyjęty przez Doktorantkę. Zastanawiający jest również wiek osób badanych, gdyż nie został on ujęty w kryteriach włączenia, a figuruje w tytule rozprawy doktorskiej. Wiek opisany został w opisie płci grupy badanej, przy czym nie ma informacji co do tego kryterium jako elementu stanowiącego podstawę włączenia do badania. Obecność lub brak takiego kryterium wpływa na dobór grupy badanej, więc stanowi to istotną informację metodologiczną, która powinna znaleźć się w rozprawie doktorskiej jako kryterium włączenia. Informacja taka widnieje dopiero w części dotyczącej omówienia poszczególnych publikacji.

Cele pracy zostały zrealizowane i opublikowane w 5 publikacjach naukowych. Pierwsze dwie z nich zaprezentowane zostały we wstępie i metodologii. Kolejne trzy z nich to:

1. Pauli N., Dziedziejko V., Safranow K., Rać M., Chlubek D., Sulikowski T., Rać M.E. A possible protective effect of the plasma PCSK9 against myocardial hypertrophy and diastolic dysfunction. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research 2022, 79 (3): 409-418. Impact factor 0,555, punktacja MEiN 100.
2. Pauli N., Kuligowska A., Krzystolik A., Dziedziejko V., Safranow K., Rać M., Chlubek D., Rać M.E. The circulating VEGF is only marginally associated with an increased risk for atherosclerosis. Minerva Cardioangiol. 2020, 68 (4): 332-338. Impact factor 1,347, punktacja MEiN 20.
3. Pauli N., Puchałowicz K., Kuligowska A., Krzystolik A., Dziedziejko V., Safranow K., Rać M., Chlubek D., Rać M.E. Association between II-6 and echo-parameters in patients with early

onset coronary artery disease. Diagnostics 2019, 9(4): art. 189. Impact factor 3,11, punktacja MEiN 70.

W publikacji nr 1 Doktorantka opisała związek osoczowego PCSK9 z wybranymi parametrami biochemicznymi, klinicznymi i badaniami dodatkowymi u pacjentów z wczesną postacią choroby wieńcowej. Metodologia została przedstawiona powyżej. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że stężenie PCSK9 było wyższe w grupie badanej, szczególnie u kobiet. Nie stwierdzono związku pomiędzy PCSK9 a wybranymi parametrami biochemicznymi, stosowanymi lekami czy obecnością zabiegów rewaskularyzacyjnych tętnic wieńcowych. Wykazano natomiast istotny związek z parametrami echokardiograficznymi - korelacje ujemne (frakcja wyrzutowa lewej komory, średnica aorty, przegroda międzyprzedsionkowa, grubość końcowo rozkurczowa ściany tylnej, czas deceleracji) oraz korelacje dodatnie (stosunek E/A, współczynnik E'/A'), ponadto z szerokością QRS w zapisie EKG. Nie wykazano związku PCSK9 z parametrami ultrasonograficznymi tętnic obwodowych i szyjnych. Autorzy sugerują możliwy ochronny wpływ osoczowego PCSK9 na przerost mięśnia sercowego i dysfunkcję rozkurczową. Badanie to jest bardzo ciekawe, nowatorskie i pozwala na zgłębienie wiedzy w zakresie ważnego tematu z punktu widzenia aktualnych zainteresowań terapeutycznych w celu redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego.

W publikacji nr 2 Doktorantka opisała analizę stężenia VEGF-A względem parametrów jak wyżej. W grupie badanej odnotowano wyższe stężenie VEGF-A, szczególnie u mężczyzn. Odnotowano dodatnie korelacje VEGF-A z parametrami biochemicznymi, takimi jak liczba leukocytów, płytek krwi, apolipoproteiną B, cholesterolem całkowitym i frakcją LDL. Nie zaobserwowano innych istotnych korelacji.

W publikacji nr 3 autorzy podjęli się analizy osoczowego stężenia interleukiny-6 z parametrami jak wyżej. Pacjenci w grupie badanej mieli wyższe stężenie Il-6, liczbę leukocytów, erytrocytów, hemoglobiny, hematokrytu oraz wskaźników morfotycznych krwi, triglicerydów. Niższe stężenia odnotowano w zakresie cholesterolu całkowitego, lipoprotein o wysokiej i niskiej gęstości, ApoA1, ApoB. Nie stwierdzono jednak korelacji z parametrami biochemicznymi w zakresie głównego badanego parametru jakim była Il-6. Interleukina-6 okazała się natomiast istotnie skorelowana z parametrami echokardiograficznymi (średnica aorty, frakcja skracania lewej komory, średnica końcowo rozkurczowa prawej komory) oraz z grubością kompleksu intima-media lewej tętnicy ramiennej.

Na podstawie zaprezentowanych publikacji Doktorantka sformułowała następujące wnioski:



1. U pacjentów z chorobą wieńcową rozpoznaną w młodym wieku niezależnymi predyktorami wyższego stężenia PCSK9 w osoczu jest płeć żeńska i długo trwające nadciśnienie tętnicze. Niejednoznaczny jest wpływ wysokich stężeń PCSK9 w osoczu na parametry morfologii serca oraz jego funkcji skurczowej i rozkurczowej ocenionymi echokardiograficznie, choć wydaje się możliwy ochronny wpływ PCSK9 na przerost mięśnia sercowego i dysfunkcję rozkurczową. Możliwe jest również plejotropowe działania PCSK9. U osób z wczesnym zachorowaniem na chorobę wieńcową oznaczanie stężenia białka PCSK9 w osoczu nie jest dobrym wskaźnikiem postępu miażdżycy tętnic szyjnych i obwodowych.
2. Słabe korelacje osoczowych stężeń VEGF-A z biochemicznymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego oraz brak nawet słabych korelacji z wczesnymi zmianami strukturalnymi ściany naczyniowej w dopplerowskim badaniu ultrasonograficznym, wskazują że cytokina ta jest tylko w niewielkim stopniu związana ze zwiększonym ryzykiem miażdżycy i nie może być wiarygodnym markerem stanu naczyń u pacjentów.
3. Stężenie Il-6 w osoczu wiąże się ze zmianami parametrów funkcji serca, potencjalnie przyczyniając się do remodelingu prawej komory i dysfunkcji skurczowej lewej komory. Sugeruje to możliwe korzyści prognostyczne wynikające z długotrwałej obserwacji stężenia Il-6 po ostrym zespole wieńcowym.

Doktorantka dokładnie przedstawiła wyniki badań dotyczących specyficznej grupy młodych osób z wczesną chorobą wieńcową. Przeprowadzone analizy parametrów biochemicznych, klinicznych i ultrasonograficznych stanowią wartościowy zasób wiedzy w tej materii. Jak podaje Doktorantka powszechne stosowanie statyn w grupie badanej może wpływać na uzyskane wyniki, jednak jest to terapia konieczna w takiej grupie pacjentów. Bardzo dobrze, że Doktorantka uchwyciła ten aspekt w swojej dyskusji.

Potencjalne wykorzystanie w praktyce analizowanych parametrów biochemicznych jako markerów czy też lepsze zrozumienie ich mechanizmów działania w grupie pacjentów młodszych jest szczególnie istotne, gdyż pacjenci w tej grupie wiekowej stanowią wyzwanie klinicznie. Zachorowanie na ostry zespół wieńcowy może prowadzić do nagłego zgonu sercowego czy też późniejszych powikłań sercowych w wieloletniej perspektywie przeżycia u tych osób, co stanowi istotny problem w zakresie zdrowia publicznego. Wyniki, dyskusja i wnioski zostały czytelnie sformułowane. Przeprowadzone badania świadczą o zrozumieniu, głębokiej wiedzy teoretycznej i doświadczeniu klinicznym Doktorantki w zgłębianej tematyce. Niewątpliwie przedstawione do oceny publikacje naukowe i całość rozprawy doktorskiej wskazują, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu

naukowego w zakresie lepszego zrozumienia mechanizmów patogenetycznych u pacjentów z chorobą wieńcową rozpoznaną w młodym wieku.

Piśmiennictwo zawarte zostało w 132 pozycjach, które właściwie odzwierciedlają zgłębianą tematykę. Obejmują one publikacje krajowe oraz w większości zagraniczne z okresu ostatnich lat przed czasem publikacji artykułów naukowych stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora.

Z obowiązków wynikających z funkcji recenzenta należy zwrócić uwagę na drobne uwagi, które nie wpływają na pozytywny wydźwięk i wysoką wartość merytoryczną przedstawionej rozprawy doktorskiej. Proponowałbym częściej używać sformułowania „tętnice” zamiast „naczyn” w kontekście rozważań nad miażdżycą, gdyż tylko ten rodzaj naczyń krwionośnych dotknięty jest procesem aterogenezy. Ponadto preferowanym mianownictwem dotyczącym elementów morfotyczny krwi jest liczba leukocytów, a nie ich stężenie. Wskazane byłoby również wyjaśnienie skrótów w języku angielskim i polskim badanych, głównych białek przy pierwszorazowym ich użyciu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Natalii Pauli całkowicie wypełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora. Moja ocena jest zdecydowanie pozytywna, w związku z czym wnoszę do Wysockiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Medycznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,  
Dariusz Kotlega  
Dr hab. n. med. Dariusz Kotlega  
prof. UZ, specjalista neurolog  
lekarz. 2243396