Prof. UJ dr hab. n. med. Jakub Podolec
Klinika Kardiologii Interwencyjnej Instytut Kardiologii
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński
w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II
E mail: jakub.podolec@uj.edu.pl tel.: 12 614 35 01

Recenzja rozprawy doktorskiej

Lek. med. Jakub Morze

pt.: **„Badanie metabolomu w ocenie ryzyka i przebiegu niewydolności serca"**

Promotorzy:

Prof. dr. hab. n. med. Andrzej Rynkiewicz

Associate Professor Marta Guasch-Ferré, Ph.D.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Lek. med. Jakuba Morze pt.: „Badanie metabolomu w ocenie ryzyka i przebiegu niewydolności serca" napisana została w postaci monografii z piśmiennictwem, streszczeniami, spisem tabel i rycin oraz zastosowanych skrótów. Praca doktorska została zrealizowana w ramach licencji Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International.

Temat badań lekarza Jakuba Morze „Badanie metabolomu w ocenie ryzyka i przebiegu niewydolności serca", jest niezwykle interesujący i rzadko poruszany w piśmiennictwie. Nadal niestety nie znamy wielu przyczyn i

patomechanizmów powstawania tego schorzenia, a rola analiz wieloczynnikowych, w tym szerokiej analizy metabolitów u pacjentów z niewydolnością serca jest bardzo obiecującym kierunkiem badań.

Niewydolność serca jest chorobą o dużym znaczeniu i w najgorszych przypadkach może prowadzić do wystąpienia nagłego zgonu sercowego, znacznego ograniczenia tolerancji wysiłku i pogorszenia jakości życia. Jest również przyczyną przeszczepienia serca. Częstość występowania niewydolności serca szacuje się na ok 0.7% populacji Świata, co pozwala nam na oszacowanie całkowitej liczby osób chorych na ok. 56 milionów osób. Liczba ta stale wzrasta, a w okresie ostatnich 33 lat podwoiła się. Rozwój i zastosowanie nowoczesnej farmakoterapii oraz urządzeń medycznych do wspomagania pracy serca poprawia rokowanie u pacjentów z NS.

Doktorant we wstępie przedstawia najważniejsze informacje dotyczące etiologii, przebiegu choroby oraz metod jej identyfikacji w tym definicję i przyczyny jej występowania, do których zalicza m.in. chorobę niedokrwienną serca, kardiomiopatie, nadciśnienie tętnicze, wady zastawkowe serca, zaburzenia rytmu (w szczególności migotanie przedsionków), choroby infekcyjne oraz wrodzone wady serca. Autor zwraca szczególną uwagę na fakt różnorodności przyczyn powstawania i rozwoju oraz definiowania niewydolności serca w ramach opracowań w podręcznikach i wytycznych europejskich oraz amerykańskich. Zwraca uwagę na konieczność poszerzania wiedzy poza klasyczne oznaczenia markerów tj. BNP, NT-proBNP, hs-cT oraz wykonywania badań obrazowych w celu monitorowania przebiegu i stopnia zaawansowania choroby.

Doktorant zauważa znaczny rozwój analiz biochemicznych, w tym licznych markerów stanu zapalnego, włóknienia oraz neurohormonalnych w procesie naprawczym mięśnia sercowego. Wnikliwie wprowadza czytelnika procesy

metaboliczne zachodzące w sercu obejmujące mitochondrialną oksydacyjną fosforylację oraz glikolizę. Następnie omawia te procesy w kontekście rozwoju niewydolności serca. Zwraca również uwagę na rolę metabolizmu tlenku azotu.

W kolejnym kroku Doktorant przedstawia dotychczasowe osiągnięcia w rozwoju metabolomiki w epidemiologii NS na podstawie badań retrospektywnych oraz prospektywnych. Lekarz medycyny Jakub Morze przytacza aktualną wiedzę i adekwatną literaturę.

Bardzo wysoko oceniam tematykę prowadzonych badań z uwzględnieniem nowoczesnych technik badań biochemicznych, które wpisują się w aktualne światowe trendy badawcze i mogą przynieść oczekiwany postęp nie tylko w poznaniu patomechanizmów niewydolności serca, ale także tworzenie nowych możliwości terapeutycznych.

Podstawowym celem badań Doktoranta, była identyfikacja szlaków metabolicznych niezależnie związanych z rozwojem NS. Konkretne kroki obejmowały:

- (Cel badawczy 1a) Ocenę powiązań pomiędzy pomiarami stężenia metabolitów w osoczu a występowaniem NS podczas długoterminowej obserwacji.
- (Cel badawczy 1b) Uzyskanie sygnatur metabolomicznych związanych z ryzykiem NS, reprezentujących wspólne ryzyko metaboliczne w patogenezie choroby.

Cele drugorzędne obejmowały:

- (Cel badawczy 2) Ocenę związku miar metabolitów w osoczu i sygnatur metabolomicznych NS z funkcją LK ocenianą za pomocą rezonansu magnetycznego.

- (Cel badawczy 3) Ocenę związku miar metabolitów w osoczu i sygnatur metabolomicznych NS z przeżyciem wśród uczestników z NS.

Przedstawione cele badawcze świadczą o dobrym rozeznaniu piśmiennictwa światowego i są próbą uzupełnienia naszej wiedzy o znaczeniu klinicznym poszczególnych markerów metabolicznych odpowiedzialnych za wystąpienie niewydolności serca, wartości prognostycznej sygnatur metabolicznych oraz ich zależności w ocenie funkcji lewej komory serca w badaniu rezonansu magnetycznego i przewidywaniu przeżywalności pacjentów z NS w długoterminowej obserwacji.

Badanie przeprowadzone zostało na dużej grupie pacjentów włączonych do bazy danych UK Biobank w Wielkiej Brytanii. W ramach badania wysłano około 9,2 miliona zaproszeń, a w 23 ośrodkach w Anglii, Walii i Szkocji zrekrutowano 502 682 uczestników. Podczas pierwszej wizyty każdy uczestnik podpisał elektroniczną zgodę, wypełnił szczegółową ankietę za pomocą ekranu dotykowego; przeszedł wywiad prowadzony przez pielęgniarkę, wykonano badania fizykalne oraz pobranie krwi, moczu i śliny. Ostatecznie do badania włączono 93,922 osób oraz 7,721 do podgrupy, w której wykonano badania rezonansu magnetycznego serca.

Dane z UK Biobank były udostępnione pod nr. 75001, w ramach projektu *"Association of Metabolomic Profiles with MRI Traits of Cardiac Structure and Function and with the Risk of Incident Heart Failure in the UK Biobank Cohort"*, przez okres trzech lat, w którym Doktorant pełnił rolę głównego badacza. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej w ramach NHS Northwest Multicenter Research Ethics Committee (approval number: 11/NW/0382).

Wysokoprzepustowa platforma Nightingale NMR wykorzystana do oceny obejmowała 168 pomiarów surowych metabolitów i 81 pomiarów względnych metabolitów zorganizowanych w 45 klasach. W brytyjskim laboratorium Biobank zlokalizowanym w Stockport w Wielkiej Brytanii próbki osocza EDTA, zostały przetransportowane w suchym lodzie do laboratoriów Nightingale Health w Finlandii. Były przechowywane w temperaturze -80 °C. Personel zaangażowany w analizy NMR był zaślepiony pod względem stanu zdrowia uczestników.

Doktorant opisał szczegółowo sposób uzyskania wyników. Mając na celu identyfikację szlaków metabolicznych niezależnie powiązanych z NS, przyjęto dwa klasyczne podejścia, stopniowe i oparte na uczeniu maszynowym. W ramach klasycznego podejścia etapowego najpierw zbadano powiązanie między 249 miarami metabolitów a epizodami zaostrzenia NS, a następnie przeprowadzono serię analiz podgrup, wrażliwości i mediacji.

Wyniki analiz Doktorant przedstawił wnikliwie i niezwykle szczegółowo oraz zgrupował je w czterech grupach: markery pojedynczych metabolitów, a ryzyko niewydolności serca, sygnatury wielometaboliczne i epizody zaostrzenia niewydolności serca, markery metabolizmu a czynność serca w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego oraz markery metabolizmu a przeżycie u pacjentów z niewydolnością serca.

Podsumowując obszerny materiał przedstawionych przez Doktoranta wyników możemy zauważyć, że 90 pomiarów metabolitów wykazało istotny związek z występowaniem NS po korekcie w testach porównawczych wielokrotnych. Należą do nich wielkość cząstek lipoprotein (średnia średnica cząstek VLDL, średnia średnica cząstek HDL), kwasy tłuszczowe (stopień nienasycenia, FA omega-3, DHA, PUFA), aminokwasy (alanina, histydyna, walina), ciała ketonowe (3- OHB, octan, acetooctan, aceton), równowaga płynów

(albumina), zapalenie (acetyle glikoprotein), bardzo duże VLDL (stężenie cząstek, trójglicerydy, lipidy całkowite), duże VLDL (stężenie cząstek, fosfolipidy, wolny cholesterol), średnie VLDL (trójglicerydy, lipidy całkowite), średni LDL (fosfolipidy, estry cholesterolu, wolny cholesterol), mały LDL (estry cholesterolu, cholesterol w), bardzo duży HDL (stężenie cząstek, fosfolipidów, estrów cholesterolu), duży HDL (stężenie cząstek, wolny cholesterol)), mały HDL (stężenie cząstek, fosfolipidów, estrów cholesterolu), cholesterol (cholesterol LDL, cholesterol w średnim LDL), stężenie cząstek lipoprotein (stężenie cząstek HDL, całkowite stężenie cząstek lipoprotein), trójglicerydy (trójglicerydy w VLDL), cholesterol estrów (estry cholesterolu w LDL) i 37 względnych miar metabolitów, w tym proporcji lipoprotein i kwasy tłuszczowe.

Analizy podgrup, wrażliwości i mediacji wykazały, że 23 specyficznych miar metabolitów miało niezależny związek z występowaniem NS. Należą do nich aminokwasy (alanina, histydyna), ciała ketonowe (octan, acetooctan, aceton, 3-hydroksymaślan), równowaga płynów (albumina), FA (DHA, FA omega-3, względna zawartość FA omega-3, stosunek kwasów omega -6 do omega-3 FA), bardzo duży HDL (zawartość wolnego cholesterolu), mały LDL (liczba cząstek, całkowita zawartość lipidów, cholesterol całkowity, estry cholesterolu, fosfolipidy) i stosunki lipoprotein (względna zawartość cholesterolu w dużych VLDL, względna zawartość fosfolipidów w bardzo małych VLDL, względna zawartość estrów cholesterolu w dużych LDL, względna zawartość estrów cholesterolu i fosfolipidów w cząstkach IDL).

Kolejną grupę analiz stanowiły sygnatury wielometaboliczne i ich zależność z występowaniem incydentalnej niewydolności serca. Największa sieć obejmowała 85 miar metabolitów związanych z różnymi klasami lipoprotein i

lipidów i została następnie podzielona na sześć klastrów. Wyniki zostały przedstawione w sposób klarowny w postaci odpowiednich rycin.

W ramach drugorzędowego celu badania Doktorant ocenił, włączając do podgrupy 7751 pacjentów, powiązania między pomiarami metabolitów a funkcją lewej komory serca w badaniach rezonansu magnetycznego. Wyższy indeks sercowy był dodatnio powiązany z 34 metabolitami, w tym związkami związanymi z glikolizą, takimi jak glukoza, mleczan i pirogronian, a także większymi średnimi cząsteczkami HDL i ich zawartością lipidów. I odwrotnie, 83 metabolity były ujemnie powiązane z wyższym indeksem sercowym. Jeśli chodzi o LVEF, badanie wykazało, że 82 pomiary metabolitów miały istotny związek z LVEF. Osiemdziesiąt z nich było dodatnio powiązanych, podczas gdy tylko jeden, fenyloalanina, był odwrotnie powiązany. Najsilniejsze pozytywne powiązanie dotyczyło krążącej albuminy. Inne dodatnio powiązane pomiary obejmowały PUFA, takie jak stopień nienasycenia i całkowite stężenie kwasów omega-3/6 FA, a także różne lipidy, takie jak choliny, SM, fosfoglicerydy i PC. Ponadto 31 pomiarów metabolitów związanych ze stężeniem cząstek IDL i LDL oraz zawartością lipidów było dodatnio powiązanych z wyższą LVEF. Pomiary ApoA1 i 24 dotyczące dużych, średnich i małych cząstek HDL również wykazały pozytywne powiązania z wyższą LVEF. W przypadku LVESVI 47 metabolitów powiązano z niższą funkcją skurczową, przy czym najsilniejsze odwrotne powiązanie dotyczyło acetylów glikoprotein. Większość z 27 metabolitów, które miały odwrotne powiązanie, należała do cząstek VLDL, w szczególności do chylomikronów i większych podklas VLDL. Mniejsze cząsteczki HDL, BCAA i kreatynina były również odwrotnie proporcjonalne do LVESVI. W przypadku LVEDVI 16 metabolitów było powiązanych z wyższymi, a 85 z niższymi wartościami. Acetyle glikoprotein ponownie wykazały najsilniejsze odwrotne powiązanie. Silniejsze negatywne powiązania zidentyfikowano w 34

metabolitach należących do chylomikronów i większych podklas VLDL, natomiast słabsze powiązania stwierdzono w przypadku mniejszych cząstek VLDL. Jeśli chodzi o SVI, badanie wykazało istotne powiązania ze 148 ze 168 miar metabolitów niezwiązanych ze stosunkiem. Najsilniejsze odwrotne powiązanie zaobserwowano w przypadku acetylów glikoprotein. W sumie 49 pomiarów związanych z cząsteczkami VLDL wykazało negatywne powiązania, przy czym większe cząstki VLDL wykazały wyraźniejsze efekty niż mniejsze. Potwierdzała to odwrotna tendencja obserwowana dla średniej VLDL.

Ostatnim zagadnieniem przeanalizowanym przez Doktoranta były markery metabolizmu w odniesieniu do przeżycia wśród pacjentów z niewydolnością serca. Do analizy miar metabolitów związanych z przeżyciem wśród pacjentów z HF włączono 690 uczestników UK Biobank, u których zdiagnozowano NS przed włączeniem do kohorty. W porównaniu z całą grupą, uczestnicy, którzy zmarli w trakcie obserwacji, byli starsi, częściej byli to mężczyźni, mieli wyższe BMI, częściej palili papierosy, częściej stosowali leki przeciwnadciśnieniowe, przeciwcukrzycowe i lipidowe. 83 ze 168 pomiarów metabolitów było istotnie powiązanych z punktem końcowym. Celem badania była również ocena powiązań między pomiarami metabolitów a przeżyciem u osób z dominującą NS. Zwiększone stężenie niektórych metabolitów, takich jak PUFA, małe cząsteczki HDL, BCAA i cząsteczki LDL, wiązało się z niższym ryzykiem śmiertelności w zakresie 18–32%. Z drugiej strony jedenaście miar metabolitów, w tym cytrynian i wyższe stężenia ciał ketonowych, wiązało się z wyższym ryzykiem śmiertelności z jakiejkolwiek przyczyny, wahającym się od 17–26%. W szczególności wyższy poziom cząstek XL HDL i zawartość w nich lipidów, a także większa średnica cząstek HDL powiązano ze zwiększonym ryzykiem śmiertelności z jakiejkolwiek przyczyny. Jeśli chodzi o śmiertelność z powodu CVD u osób z dominującą NS, wyższe stężenia DHA, kwasów omega-3 i omega-6 oraz

całkowitych PUFA wiązały się z 16-32% niższym ryzykiem zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych, co jest zgodne z ich ochronnym wpływem na śmiertelność z jakiejkolwiek przyczyny.

Podsumowanie

Na szczególną uwagę zasługuje szeroki wachlarz i szczegółowy opis przeprowadzonych badań diagnostycznych oraz diagnostyki różnicowej niewydolności serca z wykorzystaniem badań rezonansu magnetycznego, oraz kompleksowej oceny wyników badań przez międzynarodowy zespół.

Wyniki badań oraz zastosowanie nowoczesnych metod statystycznych a także precyzyjny opis tych metod świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań naukowych. Wnioski prawidłowo odpowiadały celom postawionym przez Doktoranta.

Doktorant zwraca uwagę na kilka ograniczeń wykonanych badań, do których zalicza m.in. dodatkowe wprowadzenie leczenia w okresie obserwacji, co może znacząco wpływać na rokowania i QoL pacjentów. Brak szerokiej przynależności rasowej (większość pacjentów była rasy białej) jest czynnikiem ograniczającym zasięg wniosków, które zostały opisane w pracy i mogą się one różnić w różnych miejscach na Świecie. Kolejnym czynnikiem, o którym Doktorant wspomina w części ograniczeń badania to brak centralnie ocenianych wyników leczenia, który ograniczał możliwość stratyfikacji NS według LVEF na kategorie takie jak HFrEF, HFmrEF i HFpEF.

Największym, w mojej ocenie ograniczeniem jest jednak brak wyników parametrów biochemicznych NT-pro-BNP i BNP, które są w dzisiejszej praktyce nieodzownym składnikiem oceny zaawansowania i zaostrzenia epizodów NS. Ich

brak, jak dostrzega Doktorant utrudnia porównawczą zdolność predykcyjną powyższego badania.

Ograniczenia te są ważne, ale najwyższa referencyjność Ośrodka oraz bazy danych Biobank, na podstawie, której przeprowadzono badania gwarantują najwyższy poziom i rzetelność pracy.

Badanie przeprowadzono na bardzo dużej ok. 94 tysięcznej grupie uczestników włączonych do bazy danych Biobank, co umożliwiło wykonanie analiz statystycznych o dużej mocy. Szczególnie ważne było włączenie badania obrazowego rezonansu magnetycznego u części osób, co ułatwiło połączenie badań biochemicznych z obrazowaniem czynności serca. Takie podejście jest i będzie konieczne w całościowej ocenie stanu zdrowia pacjentów z NS.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej lek. med. Jakuba Morze pozwalam sobie na wyrażenie uznania prowadzenia badań nowatorskich w tak ważnej, stale rosnącej grupie pacjentów. Dowiedziono słuszności hipotez badawczych. Doktorant wykazał, że wieloczynnikowe badania biochemiczne oraz określenie i zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej poziomów poszczególnych grup markerów mogą być przydatne zarówno w diagnostyce jak i terapii pacjentów z niewydolnością serca.

Zwracam się do wysokiej Rady Naukowej Szkoły Medycznej Uniwersytetu Warmii i Mazur w Olsztynie o dopuszczenie lek. med. Jakuba Morze do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz przyznanie wyróżnienia.

Prof. UJ dr hab. n. med. Jakub Podolec

Kraków, 14 listopada 2023 r.