Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi

Kraków, 28.12.2019

Ocena rozprawy doktorskiej

Lek. med. Katarzyny Kotuły-Horowitz

pt. „Wpływ leczenia fenofibratem na odpowiedź rozkurczową tętnicy ramiennej, oraz stężenia N1-metylonikotynamidu i homocysteiny w osoczu u osób z dyslipidemią"

Pomimo postępów w dostępności i stosowaniu nowoczesnych metod leczenia, miażdżyca i jej następstwa w postaci choroby niedokrwiennej serca oraz niedokrwienia kończyn dolnych, niewydolności serca czy zaburzeń kognitywnych pozostaje jednym z najpoważniejszych problemów medycznych w historii naturalnej chorób człowieka. Podczas gdy czynniki ryzyka miażdżycy zostały dość dobrze scharakteryzowane, poziom ich kontroli w badaniach Euroaspire pozostaje niewystarczający co przekłada się na potrzebę nowych strategii w kontroli czynników ryzyka. Właśnie tego problemu, w kontekście jednego z najlepiej scharakteryzowanych czynników ryzyka miażdżycy- dyslipidemii, dotyczy prezentowana Rozprawa lek med. Katarzyny Kotuły-Horowitz. Chociaż statyny skutecznie w obniżają stężenia cholesterolu LDL, to jednak ta grupa leków ma ograniczony wpływ na zwiększenie cholesterolu HDL i obniżenie trójglicerydów, które w patogenezie dyslipidemii odgrywają istotne znaczenie. Jest to szczególnie ważne w kontekście rozwoju dysfunkcji śródbłonka naczyniowego jako centralnego patomechanizmu wczesnych etapów miażdżycy. Zarówno HDL jak i lipoproteiny bogate w trójglicerydy modulują funkcję śródbłonka naczyniowego. Podczas gdy HDL uznaje się za cząsteczkę ochronną w wielu stanach patologicznych ochronny jej charakter jest zaburzony co określono terminem „dysfunkcyjnego HDL".

Głównym, aspektem na którym koncentruje się prezentowana rozprawa doktorska jest kompleksowe określenie plejotropowych, naczynioochronnych efektów fenofibratów poza ich szeroko poznanym działaniem na metabolizm lipidów. Ma to szczególnie ciekawe znaczenie, jako że opisano, iż fenofibraty mogą odgrywać niekorzystny efekt na zwiększanie stężenia homocysteiny w osoczu, prawdopodobnie poprzez aktywację PPARα. Jest to aspekt szczególnie

Szpital Specjalistyczny im. J. Dietla w Krakowie; tel/fax (12) 6330003; email: tguzik@cm-uj.krakow.pl

ważny, iż praca w Zespole Pani Profesor Barbary Domagały, która od lat zajmuje się tą tematyką, umożliwiła doktorantce wnikliwe zbadanie tego ważnego problemu. Pani Lek. med. Katarzyna Kotuła-Horowitz stawia hipotezę, iż N1-nikonynamid może stanowić swoisty mechanizm naczynioochronny przed potencjalnymi efektami wzrostu poziomu homocyteiny. Jest to hipoteza ważna i oryginalna, jako że w wielu tkankach wykazano aktywność metylotransferazy nikotynamidu (NNMT) - enzymu, który odpowiada za syntetazę MNA, ale z drugiej strony przyczynia się do zwiększenia stężenia homocysteiny. Wykazano także, że stężenie homocysteiny było zmniejszone o 50%, po zastosowaniu MNA (swoisty inhibitor NNMT), co sugeruje, że około połowę całkowitej produkcji homocysteiny (w mysiej tkance tłuszczowej) można przypisać aktywności NNMT. W przeciwieństwie do homocysteiny, MNA wpływa korzystnie na śródbłonek zwiększając syntezę NO.

Celem pracy Lek. med. Katarzyny Kotuły-Horowitz była ocena wpływu leczenia fenofibratem na funkcję śródbłonka ocenianą pomiarem FMD oraz stężenia homocysteiny i MNA w grupie chorych z dyslipidemią. Cel ten został zrealizowany poprzez realizację trzech celów szczegółowych: (1) badanie wpływu leczenia fenofibratem na stężenia markerów prozapalnych, prozakrzepowych oraz stresu oksydacyjnego; (2) ocena wpływu palenia papierosów na efekty leczenia fenofibratem: stężenia markerów prozapalnych i stresu oksydacyjnego (CRP i TNFα, 8-izo-PGF2α), oraz zastępcze wskaźniki miażdżycy (FMD, IMT) oraz (3) ocena wpływu fenofibratu na aktywność PON1 w surowicy uwzględniając polimorfizm genetyczny Q192R

Licząca 160 stron praca ma klasyczną budowę. Składa się z wstępu, celów i założeń pracy, materiału i metodyki, wyników dyskusji, wniosków, podsumowania, streszczeń oraz niesamowicie rozbudowanego i szczegółowego piśmiennictwa, na które składa się 641 pozycji. Sposób przedstawienia pracy jest czytelny i nie budzi zastrzeżeń. Pracę czyta się z przyjemnością. Na uwagę zasługuje bardzo sprawne posługiwanie się autorki terminologią specjalistyczną zarówno w zakresie biochemicznym jak i klinicznym.

We wstępie Doktorantka szczegółowo opisuje najpierw zagadnienia podstawowej kliniki i biochemii dyslipidemii, stawiając szczególny nacisk na aterogenną dyslipidemię, leżącą u podstaw ryzyka rezydualnego zdefiniowanego przed laty m. innymi przez badanie ACCORD. Autorka bardzo szczegółowo omawia rolę HDL oraz lipoprotein bogatych w TG w rozwoju miażdżycy aby przejść do omawiania roli leczenia fibratami u pacjentów z dyslipidemią. Omawiając te zagadnienia Doktorantka zacytowała bardzo szeroko liczne pozycje piśmiennictwa, w tym te najważniejsze. Za szczególnie ciekawy podrozdział uważam omówienie roli fibratów w terapii miażdżycy w kontekście „ery statyn", choć po części wydaje się, iż niektóre stwierdzenia autorki dotyczące skuteczności fibratów w

klinicznej redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego można uznać za nadmiernie optymistyczne. Relatywnie krótki jest też podrozdział o efektach ubocznych fibratów, choć ma to istotne znaczenie dla podjętej tematyki badawczej. W kolejnej części wstępu autorka omówiła szczegółowo mechanizmy dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, poświęcając obszerną część wstępu metodom jego pomiaru, a w szczególności wprowadzając pomiary rozkurczu mediowanego przewróceniem przepływu (flow mediated dlilatation). Ciekawe niewątpliwie byłoby omówienie FMD w kontekście innych dostępnych metod pomiarowych a także zwrócenie uwagi na konieczność wykonywania badań kontrolnych NMD (nitroglycerin induced dilatation). Ostatnia część wstępu jest poświęcona bardzo wartościowemu omówieniu metabolizmu homocysteiny i nikotynamidu oraz ich znaczenia w regulacji funkcji śródbłonka co świetnie wprowadza do przedstawionych przez autorkę hipotez i celów badania. Wstęp jest napisany jasno. Zilustrowany 2 rycinami. We Wstępie oraz w pracy poglądowej wprowadzone zostały wszystkie konieczne dla dalszego zrozumienia pracy terminy i omówiony aktualny stan wiedzy. Co zasługuje na uwagę Doktorantka dobrze przedstawiła uzasadnienie i nowatorskość swojej hipotezy badawczej. Podsumowując ocenę tej części rozprawy, we wstępie lek. med. Katarzyna Kotuła-Horowitz jasno przedstawiła potrzebę badań nad wpływem fibratów na funkcję śródbłonka w kontekście ich efektów na metabolizm homocysteiny i N-nikotynamidu. Przejrzyste i jasne ujęcie tematu we wstępie, pomimo jego znacznych rozmiarów (50 stron) wskazuje, że Doktorantka bardzo dobrze zapoznała się z omawianymi zagadnieniami i potrafi wiedzę syntetyzować i jasno przekazać.

Opis metodyki badań jest rzetelny i bardzo dokładny zarówno w części doktoratu poświęconej pomiarom biochemicznym jak i pomiarom FMD. Opis ten wskazuje na samodzielność wykonanej pracy, a także na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych. Na uwagę zasługuje wielokierunkowość wykonywanych oznaczeń mających na celu wielostronną ocenę plejotropowych efektów fibratów. Oprócz badan podstawowych, protokół badania obejmował pomiary metabolitów związanych z procesami transmetylacji, tj. MNA i homocysteiny, a których synteza jest zwiększona w następstwie aktywacji ligandem PPARα. Mierzono markery prozapalne (CRP, TNF-α), stresu oksydacyjnego (8-izo-PGF2α) oraz aktywność PON1. Wykonywano także pomiary zastępczych wskaźników miażdżycy (FMD tętnicy ramiennej, IMT tętnicy szyjnej). Pomiar wymienionych parametrów oceniano przed oraz po 6 i 12 miesiącach leczenia fenofibratem w dawce 215 mg/dobę. Opis metod badawczych jest szczegółowy i wskazuje na znaczny stopień przygotowań jakich praca ta wymagała. Szkoda, iż autorka nie była w stanie przeprowadzić badania z randomizacją, iż tylko taki układ badania pozwoliłby na jednoznaczne i niezaprzeczalne potwierdzenie obserwowanych efektów. Biorąc jednak pod uwagę, iż część efektów jak wpływ na funkcję śródbłonka był już badany w badaniach z placebo w przeszłości, uproszczony schemat badania

można uznać z wystarczający w celu wyciągnięcia wstępnych wniosków. Moją ciekawość wzbudził też fakt rekrutacji do badania tylko mężczyzn będących funkcjonariuszami policji. Zastanawia mnie w jakim stopniu może się to wiązać z dodatkowymi czynnikami ryzyka, jak np. narażenie na spaliny, co może przyczyniać się w tej grupie dodatkowo do ryzyka sercowo-naczyniowego. Podczas gdy zastosowane metody biochemiczne nie budzą moich dodatkowych pytań i komentarzy, zastanawia mnie brak wykonania pomiarów kontrolnych wobec FMD- tj. np. NMD. Wydaje się, iż uzasadnienie pominięcia tego pomiary byłoby cenne w tej części rozprawy.

Podsumowując, szczegółowy opis metodyczny stosowanych technik badawczych wskazuje, iż badania zarówno molekularne jak i czynnościowe były przeprowadzone przez doktorantkę dokładnie, ze szczególnym zrozumieniem poszczególnych technik.

Cele badań są przedstawione jasno, choć bardzo obszernie, i zostały zrealizowane w toku rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań obejmują 33 Rycin oraz 12 Tabel. W pierwszej części „Wyników", Doktorantka dokonała charakteryzacji grupy badanej, którą stanowiło 50 czynnych zawodowo funkcjonariuszy policji (mężczyźni) z hipertriglicerydemią w wieku od 32 do 58 lat oraz 50 zdrowych, także czynnych zawodowo funkcjonariuszy policji, w wieku 32-51 lat. Krew do badań pobierano wyjściowo, po 6 i po 12 miesiącach leczenia fenofibratem w dawce 215 mg/dobę w grupie chorych, natomiast w grupie kontrolnej wyjściowo oraz po 12 miesiącach. Grup[y te różniły ię szeregiem czynników ryzyka miażdżycy. Początkowo doktorantka opisała wpływ leczenie fenofibratem na parametry lipidowe. W grupie kontrolnej, która nie była leczona, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz trójglicerydów Następnie autorka skoncentrowała się na plejotropowych efektach działania fenofibratu analizując zmiany stężeń fibrynogenu w osoczu hsCRP oraz TNF-α. Niewątpliwie najciekawsze obserwacje dotyczą pomiarów zmian poziomów homocysteiny i NMA w osoczu i moczu w grupie chorych, w toku leczenia fenofibratem. Badanie wzbogacono o pomiary parametrów stresu oksydacyjnego – w postaci stężenia 8-izo-PGF2α w osoczu i moczu. W kolejnej części Wyników Doktorantka omówiła wyniki pomiarów ultrasonograficznych badań naczyń krwionośnych w tym pokazując poprawę FMD i brak zmian subklinicznej miażdżycy (IMT) w ciągu 12 miesięcy leczenia IMT. Co ciekawe, po leczeniu fenofibratem, wartość FMD była dodatnio związana ze stężeniami MNA w osoczu (B=0,103, p=0,03), oraz ujemnie ze stężeniem trójglicerydów (B=-1,400, p=0,0018). Natomiast w modelu wieloczynnikowym, uwzględniającym parametry lipidowe surowicy, MNA (w osoczu lub moczu), skorygowanym na wiek i palenia papierosów, wartość FMD była ujemnie związana tylko ze stężeniem trójglicerydów (B=-1,394, p=0,01, oraz B=-1,937, p=0,0009, MNA w osoczu,

lub moczu odpowiednio). W analizie jednoczynnikowej i wieloczynnikowej, nie wykazano natomiast związku FMD ze stężeniem homocysteiny w osoczu. Ostatnią część Wyników stanowi opis pomiarów aktywności PON1 w surowicy w grupie chorych w kontekście zmienności genetycznej PON1. W podsumowaniu, prezentowana praca opisuje wpływ leczenia fenofibratem w dawce 215 mg/dobę na liczne parametry zapalne i powiązane z funkcją naczyniową, obok dobrze poznanych efektów na profil lipidowy. Obserwowane zmiany obejmują między innymi pomiary metabolitów związanych z procesami transmetylacji, tj. MNA i homocysteiny, a których synteza jest zwiększona w następstwie aktywacji ligandem PPARα. Autorka zaobserwowała, iż terapia fenofibratem skutkuje licznymi efektami plejotropowymi, jak poprawa funkcji śródbłonka, redukcja ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego oraz w mniejszym stopniu stanu prozapalnego. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu fenofibratu na aktywność PON1. Autorka sugeruje, iż ochronny efekt na komórki śródbłonka może być powiązany ze wzrostem poziomów MNA który wpływa korzystnie na śródbłonek. Rzeczywiście, doktorantka, po raz pierwszy w literaturze opisała efekt leczenia fenofibratem na stężenie MNA co może częściowo wyjaśniać brak niekorzystnego wpływu hiper-homocysteinemii na funkcję śródbłonka, u leczonych fenofibratem chorych.

Podczas gdy większość wyników jest opisana jasno, kilka aspektów wzbudziło moje dodatkowe zainteresowanie oraz szereg pytań.

Poza dwoma pytaniami metodologicznymi które opisałem powyżej wartościowy byłby niewątpliwie schemat badania pokazujący, ile osób poddano screeningowi, aby uzyskać proponowane grupy badane. Czy autorka przeprowadziła badanie mocy statystycznej decydując o wielkości grup badanych? Moje pytanie wzbudził problem w jakim stopniu należy uznawać poziom homocysteiny i NMA jako markery funkcji śródbłonka a nie jej mechanizmy regulacyjne?

Wnioski przedstawione są zwięźle. Są klarowne i odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom badania.

Dyskusja pracy jest przeprowadzona w sposób interesujący. Omówione zostały wszystkie główne obserwacje poczynione przez Doktorantkę, w kontekście opublikowanej literatury. Warto podkreślić szczególnie nowatorski aspekt obserwacji stawiający hipotezę, iż wzrost poziomu NMA może odpowiadać po części za naczynioochronny efekt fenofibratu na funkcję śródbłonka. Niewątpliwie obserwacja ta powinna zainicjować dalsze badania w tym mechanizmów, a także badania pozwalające na ocenę związków przyczynowo skutkowych. Autorka cytuje 641 prace, co stanowi bardzo rozbudowane piśmiennictwo jednak po głębszej analizie jest ono właściwie dobrane i obejmuje najważniejsze publikacje, w tym szereg prac najnowszych. Dyskusję charakteryzuje świadoma i krytyczna analiza

uzyskanych wyników oraz zasługująca na uwagę ostrożność w ich interpretacji.

Uważam, że obserwacje poczynione w obecnej pracy będą stanowić cenną podstawę do przyszłych badań, a z tych wyników powinno skorzystać wiele zespołów badawczych.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska Lek. med. Katarzyny Kotuły-Horowitz wskazuje na dojrzałość naukową doktorantki, zarówno w podejmowaniu tematyki i celów badań jak i w ich konsekwentnej realizacji przy pomocy starannie dobranej metodyki, a przedstawione uwagi są wyrazem zainteresowania tematem jakie we mnie lektura Rozprawy wzbudziła, i w żadnym stopniu nie umniejszają jej wartości. Uważam, iż praca ta stanowi cenny wkład do światowego piśmiennictwa w tym zakresie.

W związku z tym z całą pewnością stwierdzam, iż przekazana mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego i Radzie Dyscypliny Medycyna CM UJ wniosek o dopuszczenie Lek. med. Katarzyny Kotuły-Horowitz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także wnioskuję o **wyróżnienie** prezentowanej rozprawy doktorskiej, gdyż jest ona bardzo wszechstronna i stawia unikalną w literaturze hipotezę stanowiąc przez to wkład w wiedzę dotyczącą badanej tematyki.

Tomasz Guzik

Prof. dr hab. med. Tomasz Guzik
Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie