

prof. dr hab. n. med. Ewa Koźniewska-Kołodziejska

Ocena Rozprawy Doktorskiej

lek. Karola Momota

pt. „Parametry stresu oksydacyjnego, stresu nitrozacyjnego oraz stresu
siateczki śródplazmatycznej w przewlekłej niewydolności serca
z zachowaną oraz obniżoną frakcją wyrzutową”

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

pod opieką

prof. dr hab. n. med. Agnieszki Cudnoch-Jędrzejewskiej (promotor)

i dr n. med. Małgorzaty Wojciechowskiej (promotor pomocniczy)

Rozprawa doktorska lek. Karola Momota dotyczy klinicznie ważnych i aktualnych zagadnień molekularnego podłoża przewlekłej niewydolności serca (HF).

HF jest zespołem klinicznym, który charakteryzuje się występowaniem objawów podmiotowych i/lub przedmiotowych wywołanych nieprawidłowościami strukturalnymi i/lub czynnościowymi serca, prowadzącymi do upośledzenia funkcji skurczowej i/lub rozkurczowej lewej komory.

Niewydolność serca cechuje wysoka chorobowość, znaczna liczba hospitalizacji, oraz wysoka śmiertelność. Częstość występowania niewydolności serca zależy od wieku. W ogólnej populacji osób dorosłych wynosi ona 1–2%, ale gwałtownie wzrasta po 75. roku życia. U osób w wieku 70–80 lat dochodzi do 20%. Na podstawie danych epidemiologicznych szacuje się, że w Polsce na niewydolność serca cierpi około 1 mln osób.

HF plasuje się na pierwszym miejscu wśród wszystkich zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych. Mimo postępu farmakoterapii niewydolności serca oraz terapii chorób współistniejących takich jak nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, cukrzyca II typu, i otyłość, rokowanie pacjentów z HF pozostaje poważne, śmiertelność roczna waha się w granicach 25–75%.

W oparciu o wyniki badania echokardiograficznego wyróżnia się 3 typy przewlekłej niewydolności serca: HF z obniżoną (HFrEF, LVEF $\leq$ 40%), łagodnie obniżoną (HFmrEF, LVEF w zakresie 41–49%), oraz zachowaną (HFpEF, LVEF $\geq$ 50%), frakcją wyrzutową lewej komory.

HFrEF, występująca u około 50% pacjentów z niewydolnością serca, jest najczęściej następstwem choroby niedokrwiennej i zawału mięśnia serca. Rozwój HFpEF jest związany z wielochorobowością, z takimi schorzeniami jak nadciśnienie tętnicze, dysfunkcja nerek, cukrzyca typu II i otyłość. Ten typ niewydolności serca występuje rzadziej, ale częstość jego występowania wykazuje wyraźne tendencje wzrostowe.

Mimo to, że oba główne typy HF mają wiele wspólnych czynników ryzyka i cech niekorzystnej przebudowy serca, zatwierdzone terapie niewydolności serca z obniżoną LVEF są w dużej mierze nieskuteczne u pacjentów cierpiących na niewydolność z zachowaną LVEF. Tak więc, poszukiwanie odrębności mechanizmów HFrEF i HFpEF wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla diagnostyki i strategii leczenia niewydolności serca.

W przedmiotowym piśmiennictwie podkreśla się, że rozróżnienie typów HF w oparciu o badanie echokardiograficzne jest niewystarczające i postuluje się konieczność poszukiwania specyficznych wskaźników biologicznych (biomarkerów) obu typów niewydolności serca.

Badania ostatnich lat wykazały, że na poziomie komórkowym, przewlekłej niewydolności serca towarzyszy nadmierna produkcja wolnych rodników, stres siateczki śródplazmatycznej (ER) oraz miejscowa i/lub ogólnoustrojowa odpowiedź zapalna.

A zatem, cel badań klinicznych przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej lek. Karola Momota, tj. próba zróżnicowania pacjentów z HFrEF oraz HFpEF w oparciu o określenie osocznego stężenia wskaźników biologicznych stresu oksydacyjnego, nitrozacyjnego oraz stresu siateczki śródplazmatycznej, jest istotny klinicznie i ze wszech miar uzasadniony.

Celem badań doświadczalnych było określenie wpływu zawału serca szczura i diety wysokotłuszczowej na pozawałowy poziom biomarkerów stresu nitrozacyjnego, stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego, a także biomarkera stresu siateczki śródplazmatycznej w materiale pobranym z mięśnia lewej komory serca. W tych ostatnich badaniach prześledzono także zmiany poziomu białek ścieżek odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR), po zawale mięśnia serca i wpływ diety wysokotłuszczowej na poziom tych białek.

Rozprawa doktorska lek. Karola Momota, licząca 71 stron, jest zbiorem trzech oryginalnych publikacji wieloautorskich, na który składają się dwie prace kliniczne i jedna praca doświadczalna. Prace zostały opublikowane w latach 2023-2024 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*International Journal of Molecular Sciences*, *Cardiology Journal*, *PLoS One*). Współczynnik oddziaływania *IF* tych prac wynosi odpowiednio 4,9 (140 pkt. MNiSW), 2,5 (100 pkt. MNiSW) oraz 2,9 (100 pkt. MNiSW). Ich łączny *IF* wynosi 10,3 (340 pkt MNiSW). We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, co świadczy o jego dominującym udziale w ich przygotowaniu. Potwierdzają to podpisy Doktoranta i współautorów pod wyszczególnieniem procentowego udziału poszczególnych autorów w powstawaniu publikacji zamieszczone w tabeli „Oświadczenie Współautorów Publikacji” (str. 65-67). Doktorant ocenia swój udział na od 50 do 60%. Udział ten polegał na „stworzeniu projektu, opracowaniu tekstu artykułu, analizie statystycznej oraz uzyskaniu finansowania”. Badania sfinansowano z grantu przyznanego w wyniku konkursu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz z dwóch mini-grantów studenckich przyznanych w konkursach wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Cykl publikacji został uzupełniony opracowaniem zawierającym jednostronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele i założenia prac, wyniki, wnioski, podsumowanie wyników wraz z dyskusją oraz bibliografię. Do opracowania dołączono również zgody na przeprowadzenie badań zaplanowanych w projekcie, odpowiednich Komisji Etycznych - Komisji Bioetycznej przy Uczelni Łazarskiego w Warszawie oraz II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Wstęp jest spójny i dobrze uzasadnia podjętą tematykę badawczą. Doktorant syntetycznie charakteryzuje w nim niewydolność serca jako problem kliniczny i przedstawia rolę stresu oksydacyjnego, nitrozacyjnego oraz stresu siateczki śródplazmatycznej w zaburzeniach funkcji kardiomiocytów w oparciu o aktualny stan wiedzy. Porusza też wpływ otyłości i nadmiernego spożycia nienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie na pozawałową dysfunkcję serca.

W kolejnym rozdziale rozprawy Doktorant przedstawia cele szczegółowe badań w rozbiu na część kliniczną i doświadczalną. Po nim zamieszczone są publikacje stanowiące podstawę rozprawy.

Wyniki badań klinicznych zostały opublikowane w pracach *“Evaluation of Nitrosative/Oxidative Stress and Inflammation in Heart Failure with Preserved and Reduced Ejection Fraction”* (Int J Mol Sci 2023; 24(21): 1-11) oraz *“Endoplasmic Reticulum Stress and Expression of Nitric Oxide Synthases in Heart Failure with Preserved and with Reduced Ejection Fraction – Pilot Study”* (Cardiol J 2024; 31(6): 885-894). Celem tych badań było “porównanie nasilenia stresu nitrozacyjnego (ocenianego na podstawie stężenia 3-NT oraz iNOS), stresu ER (GRP78), nasilenia stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego (MPO) w osoczu pacjentów z HFpEF i HFrEF”. Określenie „nasilenie”, nie brzmi w tym kontekście, moim zdaniem, zbyt fortunnie, zamieniłabym je na rzeczownik poziom.

Należy podkreślić, że badania przeprowadzono na dobrze wyselekcjonowanych, ale dość małych grupach pacjentów obu płci. W przypadku pierwszej pracy było to 27 pacjentów z HFpEF, 22 pacjentów z HFrEF oraz 41 pacjentów bez niewydolności serca (grupa kontrolna). W przypadku drugiej pracy, 42 pacjentów z HFpEF oraz 38 pacjentów z HFrEF. W obu grupach podobny procent badanych charakteryzował się nadwagą (wskaźnik BMI > 30 kg/m²).

W tych badaniach niewydolność serca określano na podstawie zapisu echokardiograficznego i osoczowego stężenia peptydu NT-proBNP. Badane wskaźniki biologiczne oznaczano w próbkach osocza za pomocą testu immunoenzymatycznego Elisa. Najważniejszym i innowacyjnym odkryciem badań opublikowanych w pierwszej pracy jest wykazanie, że 3-NT może stanowić marker niewydolności serca z zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory.

Pacjenci z HFpEF charakteryzowali się statystycznie wyższym osoczowym stężeniem 3-NT, w porównaniu do grupy z HFrEF i grupy kontrolnej. Co więcej, wynik ten został potwierdzony w badaniach opublikowanych w drugiej pracy, w których obserwowano wyższe stężenie iNOS w osoczu pacjentów z HFpEF w porównaniu do pacjentów z HFrEF.

W tym miejscu chciałam wyrazić swoje zdziwienie, że w dyskusji wyników w publikacji numer dwa brak jest wzmianki o tym, że autorzy odnotowali już wcześniej podobną obserwację w odniesieniu do 3-NT będącego uznanym markerem stresu nitrozacyjnego.

W tych badaniach odnotowano jeszcze jedną ciekawą obserwację. Poziom białka opiekuńczego GRP78 - markera stresu siateczki śródplazmatycznej był wyższy w osoczu pacjentów z niewydolnością HFrEF, niż HFpEF. Są to ważne wyniki, które trzeba oczywiście powtórzyć na większych grupach pacjentów, co zresztą Doktorant podkreśla w rozdziale dotyczącym ograniczeń pracy.

Celem pracy doświadczalnej *“Post-myocardial infarction heart failure and long-term high-fat diet cardiac endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in Sprague Dawley rat model”* (PloS One 2024; 19(9): e0308833) zbadanie wpływu zawału serca (MI) oraz długoterminowo stosowanej diety wysokotłuszczowej (HFD) na poziom stresu nitrozacyjnego, stan zapalny ze stresem oksydacyjnym oraz na poziom stresu siateczki śródplazmatycznej (ER). W tych badaniach do wykrycia obecności białek zastosowano metodę Western blot. Wyznacznikiem stresu nitrozacyjnego był poziom białka 3-NT oraz iNOS, stanu zapalnego wraz ze stresem oksydacyjnym był poziom mieloperoksydazy (MPO), a stresu ER białko opiekuńcze GPR78. Ponadto oznaczano poziom białek ścieżek związanych z odpowiedzią na

niewłaściwie sfałdowane białka (UPR) takich jak RE1 α , ATF6, PERK w materiale pobranym z mięśnia lewej komory serca szczurów. Do badań użyto 30 szczurów Sprague Dawley karmionych dietą o wysokiej (31%, HFD) lub normalnej (3,6%, NFD) zawartości tłuszczu. Dietę zaczęto stosować od 4 tygodnia życia szczurów przez 12 tygodni. Po 8 tygodniach diety wywoływano zawał mięśnia sercowego przez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej lub przeprowadzano operację pozorowaną (grupa kontrolna) u zwierząt w narkozie. Po kolejnych 4 tygodniach pobierano krew z prawej komory serca do oznaczenia stężenia NT-proBNP w osoczu metodą Elisa, a wycinek lewej komory serca do oznaczeń wybranych białek metodą Western blot.

Zaobserwowano, że 12 tygodni diety HFD nie wpłynęło na wielkość masy ciała szczurów kontrolnych. Natomiast po zawale serca, masa ciała zmniejszyła się istotnie jedynie u szczurów na diecie NFD, u zwierząt na diecie HFD pozostała niezmieniona.

Stężenie NT-proBNP (niestety jedyny wskaźnik niewydolności serca w tych badaniach) wzrastało w grupach z zawałem w podobny sposób niezależnie od stosowanej diety.

Najważniejsze wyniki uzyskane w tej części badań to zwiększenie poziomu 3-NT, iNOS oraz MPO po zawale wywołanym u szczurów na diecie HFD, co świadczy o niekorzystnym wpływie diety HFD na serce po zawale. Ponadto, zaobserwowano, że HFD *per se* prowadzi do zwiększenia poziomu iNOS w sercu. Ciekawe są też wyniki badań nad stresem ER w warunkach diety wysokotłuszczowej. Poziom białka GRP78 świadczący o stresie ER wzrasta zarówno po zawale u szczurów na diecie HFD jak i w grupie na diecie HFD bez zawału. Co więcej, poziom białek 3-NT i GRP78 wykazuje dodatnią liniową korelację.

Badanie szlaków białek UPR wykazuje obniżenie poziomu białka IRE1 α w pozawałowym sercu szczurów karmionych dietą HFD. Ten wynik stanowi moim zdaniem zachętę do dalszych badań nad wpływem wysokiej podaży tłuszczu na mechanizmy stresu ER, który jak wiadomo może prowadzić zarówno do przeżycia jak i śmierci komórki.

Następna część rozprawy to wyniki, które zostały podsumowane w trzech punktach.

O ile pierwsze 2 punkty są sformułowane przejrzysto, trzeci punkt budzi moje wątpliwości. Jądro najmniej czytelny fragment brzmi „W ostatniej pracy z cyklu doktorskiego wykazałem, że zarówno zastosowanie HFD, jak i wywołanie MI mają istotny wpływ na podwyższenie poziomu 3-NT oraz MPO w mięśniu lewej komory serca. Poziom iNOS w mięśniu lewej komory był również najwyższy w grupie, u której podano HFD oraz wywołano MI. Dodatkowo, wykazałem, że stres ER jest bardziej nasilony po zastosowaniu HFD niż po wystąpieniu MI” To zdanie rozumiem w ten sposób – zarówno zawał kontrolny (dieta NFD) jak zawał u szczurów na diecie HFD prowadzą do zwiększenia poziomu 3-NT, MPO oraz pobudzenia stresu SE. Niestety nie widzę tego w publikacji, z której wynika, że zawał serca u szczurów na diecie NFD nie prowadzi do zwiększenia poziomu wymienionych białek (ryc. 3 - brak jakichkolwiek istotności statystycznych, strona 6/13). Mam prośbę do Doktoranta o przedstawienie tego punktu w sposób jednoznacznie opisujący uzyskane wyniki.

Następujące potem 3 wnioski są częściowo powtórzeniem wyników zapisanych w innej formie. Wniosek 2, w moim odczuciu, ma tę samą skazę co punkt 3. syntetycznego opisu wyników. Jeżeli nie mam racji, proszę Doktoranta o wyjaśnienie.

Kolejny rozdział, dwustronicowa dyskusja i podsumowanie omawia uzyskane wyniki w konfrontacji z najnowszymi danymi piśmiennictwa (48 pozycji z przewagą pozycji z lat 2021-2024). Dyskusja jest raczej zwięzła, ale rozumiem, że przedstawiony materiał został omówiony

w poszczególnych publikacjach. Ostatni fragment dyskusji wzbudza moje uznanie, ponieważ dotyczy ograniczeń pracy dostrzeżonych przez Doktoranta i zwalnia mnie z obowiązku zamieszczenia uwag na ten temat w recenzji. Nie mniej jednak pozwolę sobie na niezgodę z jednym ze stwierdzeń. Dotyczy ono badań klinicznych i brzmi „pomiar stężenia markerów był wykonany jedynie w osoczu chorych, a nie bezpośrednio w tkance sercowej”. Moim zdaniem badanie z osocza jest właściwe w przypadku poszukiwania biomarkerów niewydolności serca, które ułatwiłyby nieinwazyjną diagnostykę.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy:

1. Czy MPO jest najlepszym markerem stresu oksydacyjnego? Zwłaszcza w świetle danych mówiących o tym, że MPO wywołuje stres oksydacyjny. Jaki inny, powszechnie klinicznie używany, wyznacznik stresu oksydacyjnego można by zaproponować?
2. Zastanawia mnie dość duża śmiertelność zwierząt w grupach kontrolnych, porównywalna ze śmiertelnością w grupach z zawałem serca. Czym była spowodowana?
4. Czy jest regułą, że szczury karmione dietą wysokotłuszczową nie przybywają na wadze?

Mimo kilku uwag, które można uznać za krytykę, uważam, że rozprawa doktorska lek. Karola Momota jest wartościowa i zawiera wiele ciekawych, nowatorskich wyników, które stanowią bardzo dobrą podstawę do kontynuacji badań w kierunku poszukiwania molekularnych mechanizmów niewydolności serca.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Karola Momota spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2018, poz. 1668).

Zwracam się wobec tego do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Karola Momota do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 16 marca 2025 r.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Koźniewska-Kołodziejska

