



**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Marta Oknińska**

**„Wpływ wieku i płci na częstość występowania komorowych zaburzeń rytmu serca w szczurzym modelu ostrego niedokrwienia lewej komory.  
Próba identyfikacji mechanizmów powstawania arytmii”**

*Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia podyplomowego z dnia 29.01.2020 r. oraz pismo Przewodniczącego Rady Naukowej CMPK z dnia 04.05.2020 r.*

Praca doktorska mgr Marty Oknińskiej dotyczy problemu ważnego powikłania niedokrwienia mięśnia sercowego, a mianowicie komorowych zaburzeń rytmu serca. Doktorantka w sposób szczególny skoncentrowała się na wpływie wieku i płci na częstość występowania tych arytmii. W badaniach wykorzystywała szczurzy model ostrego niedokrwienia lewej komory serca. Podjęty przez Doktorantkę temat zaburzeń rytmu serca jest niezwykle aktualny i istotny klinicznie, jako że arytmie, a w szczególności częstoskurcz komorowy (VT) i migotanie komór (VF), stanowią bezpośrednią przyczynę NZK (nagłego zatrzymania krążenia). Tło niedokrwienne jest w około 80% czynnikiem inicjującym te groźne arytmie.

Pomimo, że w ostatnim czasie udoskonalenie metod diagnostyki i leczenia przyczyniły się w sposób istotny do spadku śmiertelności z powodu zawału serca, to jednak śmiertelność wczesna - przedhospitalizacyjna w tej jednostce chorobowej pozostaje na niezmiennie wysokim poziomie. W fazie przedhospitalizacyjnej najczęściej dochodzi do NZK w mechanizmie VF, bowiem pojawienie się obszarów niedokrwienia mięśnia sercowego istotnie zmienia właściwości elektrofizjologiczne poszczególnych kardiomiocytów. Nasza wiedza o mechanizmach wewnątrzsercowych powstawania arytmii podczas ostrego niedokrwienia, a także wpływie czynników ryzyka takich jak wiek czy płeć na ten proces nie jest zadawalająca. Brakuje zarówno

eksperymentalnych, jak i klinicznych badań, w których koncentrowano się na problemie arytmii komorowych u płci żeńskiej z uwzględnieniem procesu starzenia się oraz patogenezy tych zaburzeń.

Należy podkreślić, że u kobiet znacznie rzadziej występują objawy kliniczne choroby niedokrwiennej serca, a ostry zespół wieńcowy i NZK stanowią u około 60% pacjentek pierwszą manifestację tej choroby, co utrudnia w sposób istotny diagnostykę i leczenie. Dlatego też, ważnym zadaniem pozostaje dokładne poznanie potencjalnych odmienności patofizjologicznych leżących u podłoża arytmii komorowych, szczególnie tych dotyczących przebudowy strukturalnej mięśnia sercowego oraz wewnątrzkomórkowego obiegu jonów wapnia w tym narządzie.

Warto podkreślić, o czym pisze sama Doktorantka, że u ludzi trudno ocenić wpływ wieku i płci na wystąpienie arytmii, ponieważ u wielu pacjentów zgłaszających się do kardiologa choroba niedokrwienności serca jest na tyle zaawansowana, że występują cechy niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego, co samo w sobie stanowi czynnik ryzyka wystąpienia arytmii.

Praca doktorska mgr Marty Oknińskiej podejmuje próbę uzupełnienia wiedzy dotyczącej wpływu czynników ryzyka takich jak wiek i płeć na występowanie zaburzeń rytmu serca w ostrym niedokrwieniu lewej komory serca, z uwzględnieniem wspomnianych wyżej wczesnych zmian strukturalnych i czynnościowych w mięśniu sercowym. Tematykę pracy uważam za bardzo istotną i dobrze wpisującą się w aktualne, światowe trendy badawcze.

Rozprawa doktorska mgr Marty Oknińskiej ma typowy układ dla prac doktorskich przedstawianych w formie monografii i obejmuje: *spis treści, wstęp, cel pracy, metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie wyników, wnioski, bibliografię, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz uchwałę Lokalnej Komisji Etycznej*. Dodatkowy podrozdział, zatytułowany: *Ograniczenia pracy* stanowi cenne uzupełnienie dysertacji i świadczy o wnikliwej analizie uzyskanych wyników oraz umiejętności poprawnego wysuwania wniosków.

We Wstępie Autorka opisała patogenezę niedokrwienia mięśnia sercowego jako czynnika inicjującego groźne arytmie, zmiany w mięśniu sercowym wywołane niedokrwieniem (zmiany metaboliczne i stres oksydacyjny, aktywację układu współczulnego oraz zaburzenia jonowe), a także mechanizm powstawania arytmii komorowych. Wprowadzenie kończy krótkie podsumowanie wiedzy dotyczące czynników ryzyka zaburzeń rytmu serca w ostrym niedokrwieniu, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu wieku i płci na występowanie epizodów NZK.

We Wstępie brakuje opisu fizjologicznego procesu starzenia się mięśnia sercowego, co jest niezwykle istotne w kontekście diskutowanych wyników dotyczących obserwowanych przez Doktorantkę zmian strukturalnych i czynnościowych w tym narządzie.

Następnie mgr Marta Oknińska uzasadniła celowość podjęcia tematu stwierdzając, że *„Nie znaleziono żadnej pracy, w której zmiany towarzyszące starzeniu obu płci byłyby badane w kontekście podatności arytmicznej serca w warunkach niedokrwienia”*.

Cele pracy doktorskiej zostały sprecyzowane jasno i odpowiadają kolejnym etapom prowadzonych badań:

1. Sprawdzenie czy częstość występowania i rodzaj arytmii w modelu ostrego niedokrwienia lewej komory u szczura są zależne od płci i wieku (telemetryczna rejestracja zapisu EKG u 3 -i 24 -miesięcznych samic i samców przez 6 godzin po niedokrwieniu).
2. Próba zidentyfikowania czynników sprzyjających wystąpieniu arytmii niedokrwionych (analiza częstości rytmu serca, czasu trwania odstępu QT, zespołu QRS, opadania załamka T; rejestracja potencjałów nasierdziowych, pomiar parametrów wewnątrzkomórkowego obiegu jonów wapnia, ocena stopnia zwłóknienia mięśnia sercowego i przerostu kardiomiocytów oraz pomiar ekspresji i lokalizacji koneksyny 43).

Metodyka pracy przedstawiona jest przejrzystie i niewątpliwie jej zrozumienie ułatwiają ryciny uzupełniające. Do pracy mgr Marta Oknińska włączyła 100 samic i samców szczurów szczepu Wistar w dwóch grupach wiekowych (3 i 24 miesiące), u których wywołano ostre niedokrwienie lewej komory serca poprzez podwiązanie zstępującej lewej tętnicy wieńcowej lub przeprowadzono operację pozorowaną po wcześniejszym wszczępieniu odbiornika telemetrycznego celem rejestracji EKG. W celu oszacowania wielkości obszaru niedokrwionego oceniano echokardiograficznie kurczliwość ścian lewej komory serca. Następnie przez 6 godzin od operacji analizowano zapis EKG (częstość rytmu serca, średni czas trwania zespołów QRS, odstępów QT, średni czas opadania załamek T, liczbę dodatkowych pobudzeń komorowych, częstości skurczów komorowych oraz epizodów migotania komór). Należy podkreślić, że celem ograniczenia wpływu hormonów na otrzymane wyniki do pracy włączono samice w tej samej fazie cyklu (*proestrus*; 2-3 dzień cyklu), co stanowi niewątpliwą zaletę pracy badawczej.

Doktorantka w wyczerpujący sposób opisała zarówno przebieg poszczególnych zabiegów operacyjnych, badań czynnościowych i obrazowych (EKG, ECHO, rejestracja potencjałów nasierdziowych) oraz badań histopatologicznych.

W Metodyce brak jest informacji dotyczącej oceny pomiaru przerostu kardiomiocytów. Doktorantka nie podała także śmiertelności w poszczególnych grupach zwierząt. Jedynie na s. 33 wspomniała: „Ze względu na dużą śmiertelność w grupie 24 -miesięcznych samców poddanych indukcji niedokrwienia, grupę tę powiększono o kolejnych 12 zwierząt”. Proszę o uzupełnienie tych informacji w trakcie obrony pracy doktorskiej. Prosiłabym także o wyjaśnienie wyboru wodzianu chloralu jako środka znieczulającego dla zwierząt.

Powyższy rozdział Doktorantka zakończyła opisem słusznie zastosowanych w pracy analiz statystycznych.

W kolejnym rozdziale mgr Marta Oknińska rzeczowo i wyczerpująco zaprezentowała uzyskane wyniki, uzupełnione o liczne ryciny, co istotnie ułatwia analizę przedstawianych danych. Wielkość obszaru niedokrwienia nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami zwierząt, co pozwoliło na dalsze analizy otrzymanych wyników. Wynosiła ona ok. 30% (oszacowana na podstawie indeksu WMI obliczonego w badaniu echokardiograficznym), co u małych zwierząt najczęściej powoduje zaburzenia hemodynamiczne.

Porównanie grup z uwzględnieniem dwóch czynników różnicujących (wiek oraz płeć) wykazało istotny statystycznie wzrost liczby wczesnych pobudzeń dodatkowych komorowych (EPVBs), a także groźnych arytmii komorowych (VT/VF) w pierwszej godzinie niedokrwienia u starych samców w porównaniu z pozostałymi grupami zwierząt.

Doktorantka w swojej pracy wykazała, że czynnikami skorelowanymi z ryzykiem wystąpienia arytmii u zwierząt z ostrym niedokrwieniem lewej komory były:

- zwolnienie przewodzenia śródkomorowego (czas trwania QRS),
- wydłużenie czasu repolaryzacji (czas trwania QT),
- zwiększona śródścienna dyspersja repolaryzacji (czas opadania załamka T),
- spadek czynności transportowej ATP-azy wapniowej siateczki śródplazmatycznej (SERCA),
- wzrost stopnia włóknienia mięśnia sercowego,
- spadek gęstości koneksyny 43 w obrębie wstawek,
- relatywnie większy przerost kardiomiocytów.

W Dyskusji mgr Marta Oknińska w oparciu o wyniki własne oraz dostępne piśmiennictwo omówiła wpływ wieku i płci na występowanie arytmii niedokrwieniowych, a także przeanalizowała czynniki indukujące groźne arytmie komorowe, jak również warunki sprzyjające zawiązaniu się oraz propagacji tych arytmii.

Rozprawę kończy kilka, w większości słusznych wniosków z przeprowadzonych badań:

- **wniosek nr 1: „Częstość występowania arytmii wywołanych niedokrwieniem jest zależna od płci i wieku. Pozawałowe arytmie są częstsze i mają groźniejszy przebieg u samców w podeszłym wieku niż u samic i zwierząt młodych”.** Proponowałabym wniosek nr 1 podzielić na dwa oddzielne i unikać terminu pozawałowej martwicy, gdyż Doktorantka nie stwierdziła w swojej pracy biochemicznych cech martwicy mięśnia sercowego, co jest niezbędnym warunkiem dla stwierdzenia obecności zawału serca.
- **wniosek nr 6: „W prewencji pierwotnej u osób zagrożonych wystąpieniem ostrych epizodów niedokrwiennych należy uwzględnić interwencje zapobiegające rozwojowi włóknienia, przyśpieszeniu częstości rytmu serca i wydłużeniu odcinka QT...”.** Wniosek nr 6 w mojej ocenie jest zbyt daleko idący, gdyż badań na gryzoniach nie można w sposób bezpośredni przenieść na ludzi, pomimo zbieżnych mechanizmów indukcji arytmii niedokrwiennych u tych dwóch gatunków. Użyte w pracy doktorskiej 24 -miesięczne samice posiadały okresowo owulację i nie stanowiły idealnego odniesienia dla kobiet w okresie menopauzy, o czym pisze sama Doktorantka na s. 102 w rozdziale *Ograniczenia pracy.*

W pełni zgadzam się z Doktorantką, że „W celu ostatecznego ustalenia wpływu hormonów żeńskich na podłoże antyarytmiczne i reakcję na niedokrwienie, należałoby wzbogacić pracę o grupę samic, u których w średnim wieku przeprowadzono ovariectomię”. Niemniej jest to zagadnienie, które wyraźnie wykracza poza cele podstawowe przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej.

W mojej ocenie interesujące dla dalszego rozwoju wiedzy byłoby zbadanie szlaków wewnątrzkomórkowych aktywowanych podczas procesu włóknienia, m. in. szlaku TGF- $\beta$  aktywującego wewnątrzkomórkowe białko SMAD (wspomnianego zresztą przez Doktorantkę w *Dyskusji*) a także przeprowadzenie obserwacji odległych. Trzeba jednak dodać, że obserwacje odległe wydają się niezwykle trudnym zadaniem, biorąc pod uwagę istotny wzrost śmiertelności zwierząt skorelowany z ich zaawansowanym wiekiem.

W pracy zauważyłam nieliczne drobne błędy stylistyczne i terminologiczne [np. „częstość rytmu HR” (spis treści) zamiast „częstość rytmu serca HR”, „determinantem szybkości przewodzenia” (s. 91) zamiast „determinantą szybkości przewodzenia”, niestosowany w oficjalnych wytycznych towarzystw kardiologicznych termin „nagły zgon sercowy” i odpowiednio skrót (NZZ) powinien być zastąpiony wyrażeniem „nagłe zatrzymanie krążenia” (NZK).

Podsumowując uważam, że recenzowana praca doktorska mgr Marty Oknińskiej stanowi oryginalny dorobek naukowy o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska pod tytułem „*Wpływ wieku i płci na częstość występowania komorowych zaburzeń rytmu serca w szczurzym modelu ostrego niedokrwienia lewej komory. Próba identyfikacji mechanizmów powstawania arytmii*” w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych (...) (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim (...) (Dz. U. 2016 poz. 1586).

Mając na uwadze powyższe przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Medycznego Szkolenia Podyplomowego wnioski o dopuszczenie mgr Marty Oknińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę poruszoną w pracy tematykę, wysoki poziom badań naukowych przedstawionych w dysertacji a także sposób ich prezentacji oraz charakter translacyjny otrzymanych wyników wnoszę o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

Warszawa, 23 czerwca 2020 r.

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska



