



Recenzja pracy  
Wniosek o wydatki

Prodzikan  
Wydziału Lekarskiego  
ds. Nauki  
*Małgorzata Pawłowska*

**UNIwersytet Medyczny**

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Analityki Medycznej

Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej

dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. UMW

Wrocław, 11.07.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Justyny Kubackiej**

**pt.: „Znaczenie wybranych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w średnim wieku”, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.**

**Promotor- dr hab. n. med. Anna Stefańska, prof. UMK**

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,**

**Wydział Lekarski Collegium Medicum w Bydgoszcy**

Metabolomika stanowi prężnie rozwijającą się dziedzinę nauki, zajmującą się analizowaniem metabolitów powstających w komórkach żywych, celem oznaczenia zestawów produktów reakcji metabolicznych w przebiegów różnorodnych przemian fizjologicznych lub patologicznych w organizmie. Do tej grupy związków zalicza się m.in. aminokwasy, lipidy, peptydy, witaminy, kwasy organiczne czy węglowodany. Początek koncepcji metabolomiki sięga lat 70tych ubiegłego wieku, kiedy to stwierdzono, iż ilościowe i jakościowe oznaczanie produktów przemiany materii w płynach ustrojowych może odzwierciedlać biologiczny stan organizmu. W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił gwałtowny rozwój tej dziedziny nauki, głównie z uwagi na nowe technologie oraz coraz szersze bazy danych, dotyczące ludzkiego metabolomu. Przykładem zastosowania metabolomiki w medycynie może być onkologia, w której dzięki analizie metabolomu przyspieszono proces diagnostyczny choroby, określenie typu nowotworu i stadium jego zaawansowania, co niewątpliwie daje wyższą szansę przeżycia dla pacjenta. Podobnie, metabolomika znalazła szerokie wykorzystanie w chorobach metabolicznych, jak miażdżyca, cukrzyca typu 2, zespół metaboliczny, a w konsekwencji również w chorobach sercowo-naczyniowych.

Biorąc pod uwagę fakt, iż ryzyko chorób sercowo-naczyniowych stale rośnie, ze szczególną intensywnością wśród kobiet, poszukiwanie nowym biomarkerów, pozwalających na wczesną identyfikację osób z grupy podwyższonego ryzyka, a także monitorowanie

indywidualnego ryzyka metabolicznego jest zagadnieniem bardzo istotnym. Dodatkowo analiza aminokwasów rozgałęzionych oraz metabolitów Trp w aspekcie rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2 jest zagadnieniem podejmowanym w literaturze od niedawna, jednak dane na ten temat są niejednoznaczne. Z uwagi na powyższe, cel i założenia, przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, są niezwykle ważne, nowatorskie i wpisują się w ogólnoświatowe trendy naukowe i kliniczne.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem na podstawie cyklu 4 publikacji: 2 przeglądowych (obie w języku polskim) i dwóch oryginalnych (w języku angielskim). Prace przeglądowe opublikowano w Wydawnictwie Naukowym TYGIEL, natomiast prace oryginalne, odpowiednio w *Nutrients* oraz *Metabolites* (wydawnictwo MDPI), o znaczącym współczynniku wpływu. Doktorantka określiła swój udział w powstaniu powyższych publikacji na 55-85%, co potwierdzono w oświadczeniach współautorów. W każdej z przedstawionych prac Pani Justyna Kubacka jest pierwszym autorem.

Dysertację rozpoczyna spis treści, wykaz skrótów oraz wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Właściwą treść rozprawy rozpoczyna zwięzły wstęp, który w sposób syntetyczny i kompleksowy omawia zagadnienia związane z tematem rozprawy doktorskiej. Podczas przygotowywania rozprawy zachowano logiczną kolejność. W mojej ocenie, układ pracy jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami dotyczącymi rozpraw doktorskich.

Głównym założeniem i celem rozprawy doktorskiej Pani Justyny Kubackiej była ocena zależności pomiędzy stężeniem aminokwasów rozgałęzionych (BCAAs) i tryptofanu oraz wybranych metabolitów tryptofanu a kardiometabolicznymi czynnikami ryzyka u kobiet z normoglikemią i nieprawidłową glikemią. Cele szczegółowe rozprawy obejmowały: a) analizę literatury na temat znaczenia wybranych aminokwasów jak: tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina, glicyna, arginina, glutamina oraz aminokwasów rozgałęzionych jak: leucyna, izoleucyna i walina, w zaburzeniach metabolicznych prowadzących do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych; b) analizę roli aminokwasów rozgałęzionych w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2, c) ocenę zależności pomiędzy stężeniem BCAAs a czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, z uwzględnieniem statusu glikemicznego oraz d) ocenę związku tryptofanu i metabolitów tryptofanu z występowaniem T2D i kardiometabolicznych czynników ryzyka. Według mojej oceny główny cel pracy oraz cele szczegółowe zostały sformułowane poprawnie, opisane rzeczowo i zrozumiale, a sam pomysł Autorki, dotyczący analizy wybranych elementów metabolomu kobiet w aspekcie zaburzeń metabolicznych sprzyjających rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych uważam za bardzo interesujący i niezwykle istotny w praktyce klinicznej. Co prawda dostępna literatura opisuje wybraną grupę aminokwasów np. rozgałęzionych w ChSN,

niemniej jednak istnieją ograniczone i rozbieżne dane na temat ich znaczenia u kobiet w okresie okołomenopauzalnym lub postmenopauzalnym. Dlatego uważam, iż kompleksowa analiza stężeń wybranych aminokwasów i ich metabolitów w aspekcie ryzyka kardiometabolicznego nosi znamiona innowacji.

W rozdziale „Metody badawcze zastosowane w pracach oryginalnych”, liczącym 2 strony, Doktorantka opisuje materiał badany, zastosowane metody badawcze, parametry oznaczane/wyliczane, kryteria wykluczenia. Autorka przeprowadziła badanie w grupie 349 kobiet w wieku 40-60 lat, prezentujących normoglikemię lub nieprawidłową glikemię. Drugą grupą badaną było 128 kobiet cierpiących z powodu otyłości, w wieku 41-60 lat, z normoglikemia lub cukrzycą typu 2.

W podrozdziałach „Podsumowanie prac przeglądowych” oraz „Podsumowanie wyników prac oryginalnych” Doktorantka bardzo zwięźle przedstawiła wyniki swojej pracy. Zwróciła uwagę na omówienie zagadnień związanych ze znaczeniem wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych, zdefiniowano pojęcie i zakres zaburzeń. Omówiono aminokwasy jak: glicyna, arginina, glutamina, aminokwasy rozgałęzione i aromatyczne, wykazujące ścisły związek z otyłością i zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. Skupiono się także na analizie dostępnej literatury na temat znaczenia aminokwasów rozgałęzionych w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2, zwracając szczególną uwagę na zapalne podłoże tych chorób. W dalszej części Pani Kubacka wykazała istotnie wyższe stężenie BCAAs w surowicy kobiet z dysglikemią, które korelowały ze stężeniem wapnia całkowitego, wapnia skorygowanego, hemoglobina glikowaną i stężeniem glukozy, cholesterolem frakcji HDL oraz wskaźnikiem aterogenności TG/HDL-C. Wzrost stężenia BCAAs o 10  $\mu\text{mol/L}$  był istotnym predyktorem podwyższonego stężenia wapnia, wapnia skorygowanego, hemoglobiny glikowanej oraz obniżenia stężenia HDL-Chol. Co ciekawe, analiza mocy diagnostycznej testu do klasyfikacji choroby wykazała, iż BCAAs wykazują dobrą wartość diagnostyczną testu dla podwyższonego stężenia wapnia całkowitego i wapnia skorygowanego, który ma istotny związek z rozwojem chorób metabolicznych i w konsekwencji sercowo-naczyniowych, co pośrednio potwierdzono w analizie korelacji. Analiza aminokwasów i szklaku KP w grupie kobiet otyłych z cukrzycą typu 2 wykazała wyższe stężenia Trp, kwasu kinurelinowego, stosunku kwasu kinureninowego i kwasu chinolinowego oraz stosunku kwasu kinureninowego do 3-hydroksykinureniny w porównaniu do osób z normoglikemią. Wykazano, iż czynnikiem indukującym wzrost większości powyższych parametrów była cukrzyca typu 2.

Szczególną uwagę zwraca starannie przygotowane omówienie wyników i dyskusja. Na podstawie analizy literatury Autorka wykazała, iż zmiany metabolizmu aminokwasów

rozgałęziony mają istotny wpływ na zaburzenia kardiometaboliczne, a uogólniony stan zapalny, nawet o niskim stopniu nasilenia oraz otyłość, również jako choroba o podłożu zapalnym, są związane z przekierowaniem szklaku kinureninowego oraz metabolizmu aminokwasów rozgałęzionych na wytwarzanie metabolitów tryptofanu niższego rzędu oraz akumulację aminokwasów rozgałęzionych w organizmie. W analizie uzyskanych wyników autor cechuje się wysokim poziomem krytycyzmu, stwierdzając m.in., iż na podstawie otrzymanych wyników nie ma możliwości ustalenia związku przyczynowo-skutkowego. Zasluguje to na uznanie, ponieważ świadczy o znacznej dojrzałości naukowej Doktorantki, która skrupulatnie i konsekwentnie odnosi się do otrzymanych wyników i nie formułuje daleko idących, nieodnoszących się do wyników, sugestii. W oparciu o wcześniejsze doniesienia na temat procesów mechanistycznych, Autorka proponuje możliwe ścieżki sygnalizacyjne, mogące być przyczyną akumulacji BCAAs. Innowacją w badaniach Pani Kubackiej było wykazanie jednocześnie związku pomiędzy podwyższonym stężeniem BCCAs i wapnia a zaburzoną gospodarką węglowodanową. Dodatkowo, wykazano, iż kobiety otyłe z cukrzycą typu 2 charakteryzowały się wyższym stężeniem Trp, kwasu kinureninowego oraz wskaźników Kyna/QA i Kyna/3HKyn, niezależnie od współwystępowania innych czynników. W badaniu Doktorantka zastosowała kryteria wyłączenia, które pozwoliły na wyeliminowanie czynników mogących wpływać na wyciągnięcie fałszywych wniosków w grupie badanej. To również świadczy o umiejętności konstruowania badań naukowych przez Doktorantkę. W tym miejscu na uznanie zasługuje Pani Promotor, będąca mentorem Pani Kubackiej. Autorka umiejętnie odniosła wyniki swojej pracy do dotychczasowych doniesień literaturowych, wskazując na potencjalne przyczyny rozbieżności wyników.

W dalszej części czytelnik znajduje podrozdział opisujący ograniczenia prac oryginalnych autorstwa Doktorantki. Świadomość autorki na temat wymienionych ograniczeń ponownie wskazuje na dużą dojrzałość naukową i wróży karierę wnikliwego i dociekliwego naukowca.

Na podstawie przeprowadzonych badań i szerokiej dyskusji Doktorantka sformułowała 4 wnioski. Większość wniosków wynika z uzyskanych wyników i odpowiada postawionym przez Doktorantkę celom. W mojej opinii jeden wniosek wynika z przypuszczenia na podstawie analizy literatury dotyczącej potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw związku BCAAs z zaburzeniami metabolicznymi i nie wynika bezpośrednio z uzyskanych wyników. Główna konkluzja wskazuje na istotny udział aminokwasów rozgałęzionych i aromatycznych oraz ich metabolitów w zaburzeniach kardiometabolicznych u kobiet w wieku 40-60 lat. Potwierdzono także związek pomiędzy stężeniem BCAAs a stężeniem wapnia i HbA1c w stanie nieprawidłowej glikemii. Ewidentnie udokumentowano związek pomiędzy cukrzycą typu 2

a podwyższonym stężeniem Trp oraz kwasu kinureninowego oraz wzrostem wskaźnika Kyna/3HKyn. Wykazano, iż w przypadku normoglikemii zmiany ilościowe dotyczące metabolitów szlaku kinureninowego tryptofanu wynikają z podwyższonej masy ciała (BMI).

Pracę kończy krótki opis potencjalnych implikacji klinicznych uzyskanych wyników badań oraz spis literatury, w którym odniesiono się do 86 pozycji literaturowych, wyłącznie obcojęzycznych, przedstawiających doniesienia z lat 1968-2022.

W rozdziale 13 i 14 zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Autorka w sposób klarowny i zrozumiały przedstawiła założenia, metodykę, uzyskane wyniki i wnioski z rozprawy doktorskiej.

Według mojej opinii, wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań są niezwykle interesujące, mają wysoki potencjał implikacyjny i mogą stanowić preludeum do dalszych badań w tym zakresie. Jako recenzent, a zarazem specjalista laboratoryjnej diagnostyki medycznej, z wielką przyjemnością mogę stwierdzić, iż powyższe wyniki mogą okazać się w przyszłości cennymi danymi w opracowaniu nowych algorytmów diagnozowania i monitorowania chorych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej.

Z obowiązku jako Recenzenta przedłożonej rozprawy doktorskiej chciałabym przedłożyć pojedyncze sugestie, które w przyszłości mogą prowadzić do udoskonalenia prac naukowych Autorki. Nie udało się Doktorantce uniknąć pojedynczych błędów interpunkcyjnych (str. 6, 10, 24, 27, 28), logiczno-językowych (np. współwystępują razem), skrótów myślowych (np. krew pełna EDTA, zamiast krew pełna pobrana na antykoagulant EDTA, str. 14). Doktorantka często odwołuje się do „poziomów” zamiast stężeń wybranych aminokwasów (np. str. 10, 11, 22, 24). Poprawnym byłoby doprecyzowanie definicji pojęcia „dysglikemii” przyjętego w pracy, aby czytelnik miał świadomość, które osoby zostały włączone do tej grupy np. wszystkie osoby ze stężeniem glukozy w osoczu na czczo  $\geq 100$  mg/dl, albo osoby z nieprawidłową glikemią na czczo i osoby z cukrzycą, czy osoby z nieprawidłową tolerancją glukozy i nieprawidłową glikemią na czczo. W piśmiennictwie zastosowano różne formy cytowania: wszystkie słowa w tytule pisane wielkimi literami oraz tytuły zgodnie z pisownią w języku polskim. Pragnę jednak stanowczo podkreślić, iż wskazane przeze mnie sugestie nie ujmują, w żadnym wypadku, wysokiej, merytorycznej jakości rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, iż przedłożona do recenzji dysertacja jest przemyślaną oraz dobrze zaprojektowaną pracą i zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej. Wyniki badań przedstawiono w sposób logiczny, rzetelny, przejrzysty i konsekwentny, co potwierdza umiejętność Doktorantki samodzielnego projektowania i prowadzenia prac badawczych. Potwierdzony przez współautorów, wysoki wkład Autorki w powstanie artykułów

naukowych, stanowiących cykl prac, świadczy o dużym wysiłku Doktorantki, podczas przygotowywania rozprawy. W związku z powyższym wnioskuję o uznanie powyższej dysertacji za wyróżniającą się.

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pani Justyny Kubackiej pt.: „Znaczenie wybranych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w średnim wieku” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymogi zwyczajowe i ustawowe, stawiane rozprawom doktorskim w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. (Dz. U. 2018, poz. 1668). W związku z powyższym mam ogromny zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy **wniosek o dopuszczenie Pani Justyny Kubackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**



Signed by /  
Podpisano przez:

Iwona Dorota Bil-  
Lula

Date / Data:  
2023-07-11 11:32