



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Recenzja pozytywna
wniosek o wyróżnienie
MPANSADE

Sosnowiec/30.06.2023 r.

Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej i Diagnostyki
Laboratoryjnej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.sum.edu.pl

Profesor SUM naukowo-badawczy
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczołka
winsz@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 11 50
fax: (+48 32) 364 11 57
chem_klin@sum.edu.pl

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
mgr Justyny Kubackiej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Tytuł pracy: **Znaczenie wybranych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w średnim wieku**

Promotor: **dr hab. n. med. Anna Stefańska, prof. UMK**
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej

Obserwowane na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci zmiany społeczno-ekonomiczne, związane ze wzrostem gospodarczym i uprzemysłowieniem, wraz z towarzyszącą modyfikacją stylu życia, legły u podstaw lawinowego rozwoju chorób układu krążenia u ludzi. Ryzyko globalnego rozpowszechnienia wymienionych schorzeń wiąże się bowiem z – będącymi często efektem niewłaściwych zachowań żywieniowych – otyłością, dyslipidemią, nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą, insulinoopornością czy ogólnoustrojowym stanem zapalnym. Wśród czynników mających wielce prawdopodobny związek z rozwojem chorób kardiometabolicznych wymienia się aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach (BCAA, *branched-chain amino acid*) oraz aromatyczne. Wskazuje się, że podwyższone stężenia wymienionych związków organicznych we krwi korelują z otyłością i zwiększonym ryzykiem insulinooporności i cukrzycy typu 2 (T2D, *type 2 diabetes*). Z uwagi na powyższe oraz na fakt, że zapadalność i śmiertelność związana z zaburzeniami układu sercowo-naczyniowego (CVD, *cardiovascular disease*), rozpoznawanymi u coraz młodszych pacjentów, szczególnie płci żeńskiej, stale rośnie, procedury diagnostyczne i terapeutyczne dedykowane CVD są obecnie niezaspokojoną potrzebą kliniczną. Stąd też, badania, pod wspólną nazwą: „Znaczenie wybranych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w średnim wieku”, prowadzone przez Panią magister Justynę Kubacką, pod opieką Pani dr hab. n. med. Anny Stefańskiej, prof. UMK, wpisujące się w powyższy nurt badań naukowych, uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie klinicznych.

Rozprawa doktorska mgr Justyny Kubackiej, której celem było oszacowanie znaczenia wybranych BCAA oraz tryptofanu i jego metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w wieku średnim, o typowym układzie dla opracowań naukowych z dziedziny nauk medycznych, została przygotowana na podstawie monotematycznego cyklu czterech publikacji, których teksty stanowią integralny element dysertacji.

Poprzedza je kilkudziesięciostronicowe, polskojęzyczne wprowadzenie, obejmujące między innymi: wykaz skrótów, wstęp i cel pracy, metody badawcze, podsumowanie i omówienie wraz z dyskusją wyników, ograniczenia prac oryginalnych, wnioski z implikacjami praktycznymi, jak i streszczenia.

Prace, będące podstawą rozprawy, zostały opublikowane w latach 2020 – 2022, dwie z nich o charakterze prac poglądowych, jako części monografii (Wydawnictwo Naukowe *TYGIEL*), zaś dwie oryginalne na łamach czasopism: *Nutrients* i *Metabolites*. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś jej wiodący udział w powstaniu tych prac wiązał się z analizą literatury naukowej właściwej dla ich przedmiotu, opracowaniem koncepcji prac, współuczestniczeniem w doborze osób do grup badanych, wykonywaniem oznaczeń, analizą i interpretacją uzyskanych wyników, oraz przygotowaniem manuskryptów zgodnie z wymaganiami technicznymi wydawcy. Pozostali współautorzy – zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami – wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac przez Panią mgr Justynę Kubacką, jako części składowych Jej rozprawy doktorskiej, przygotowanej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów.

Należy podkreślić, że dwie z omawianych prac zostały opublikowanych w wymienionych wyżej, prestiżowych czasopismach naukowych, indeksowanych w interdyscyplinarnej bazie *Journal Citation Reports*, o łącznej wartości wskaźnika oddziaływania (IF, *impact factor*) wynoszącym 12,287. Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa dla tych prac wynosi 240.000, podczas gdy liczba punktów – 280.000 odnosi się do wszystkich czterech artykułów współtworzących rozprawę. Powyższe wskazuje, że przedmiotowe prace, będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora, zostały wcześniej poddane wysoce wymagającym procesom recenzji i spełniły wymagania stawiane w światowych, renomowanych czasopismach naukowych.

Nadrzędny, wspomniany wyżej, cel pracy doktorskiej został osiągnięty przez Autorkę poprzez realizację kolejnych, logicznie powiązanych celów podrzędnych, obejmujących ocenę zależności pomiędzy całkowitym surowiczym stężeniem BCAAs a czynnikami ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w wieku okołomenopauzalnym, cechujących się normoglikemią lub dysglikemią, oraz ocenę związku tryptofanu i jego metabolitów z szlaku kinureninowego z występowaniem T2D i metabolicznymi czynnikami omawianego ryzyka u otyłych kobiet w średnim wieku.

Na przeprowadzenie badań, stanowiących powyższe cele pracy, wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy (numer zgody KB 392/2018, pismem z dnia 25.05.2018 r.).

Pierwsze dwie publikacje noszące tytuły odpowiednio: „Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych” oraz “Znaczenie aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) w insulinooporności i cukrzycy typu 2”, będące przeglądem i analizą aktualnej literatury naukowej, wskazują na rolę nieprawidłowych przemian aminokwasów, w tym – leucyny, izoleucyny, waliny, glicyny, tryptofanu, czy argininy i glutaminy, w rozwoju zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej, stanowiących ogniwo patogenetycznych zmian prowadzących do ujawnienia się chorób sercowo-naczyniowych. Co więcej, Doktorantka sugeruje, że ocena stężeń aminokwasów rozgałęzionych i aromatycznych, jak i metabolitów tych związków może zostać zastosowana jako potencjalny wskaźnik przewidywania ryzyka rozwoju omawianych

patologii. Zatem tematyka tych prac doskonale wprowadza czytelnika w zakres badań prowadzonych przez Doktorantkę a opisanych w kolejnych eksperymentalnych pracach.

I tak w pierwszej pracy oryginalnej noszącej tytuł: „The association between branched-chain amino acids (BCAAs) and cardiometabolic risk factors in middle-aged caucasian women stratified according to glycaemic status”, Doktorantka w grupie 184 kobiet z normoglikemią (NG) i 165 z dysglikemią (DG, tj. z T2D, z nieprawidłową glikemią na czczo, z wartością wskaźnika insulinooporności HOMA-IR < 2.3) oceniła związek całkowitego stężenia BCAAs (leucyny, izoleucyny i waliny) z wybranymi czynnikami ryzyka kardiometabolicznego. Wśród tych czynników oszacowała parametry wskazujące na: hiperlipidemię, nadciśnienie tętnicze, nasilony stan zapalny, stłuszczenie wątroby i obniżony szacowany współczynnik przesączania kłębuszkowego (eGFR, *estimated glomerular filtration rate*), a ponadto hiperkalcemię. Wyniki powyższych analiz potwierdziły znany związek pomiędzy BCAA a insulinoopornością i cukrzycą, bowiem Autorka wykazała istotnie wyższe wartości stężeń BCAAs we krwi kobiet z dysglikemią. Ponadto, przeprowadzona – po uwzględnieniu wartości BMI oraz wieku pacjentek mających istotny wpływ na przemiany omawianych aminokwasów – ocena związku BCAAs z czynnikami ryzyka kardiometabolicznego u kobiet z grupy DG, pozwoliła na stwierdzenie istotnych zależności z całkowitym stężeniem wapnia (TCa), skorygowanym stężeniem wapnia (CCa), stężeniem hemoglobiny glikowanej (HbA1c), glukozy, wartością HOMA-IR, stężeniem cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL-C, ujemna korelacja), triacylogliceroli (TG) oraz TG/HDL-C. Co więcej, u grupie kobiet z dysglikemią Doktorantka dowiodła, że współwystępowanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej z stężeniami BCAAs powyżej 475 $\mu\text{mol/L}$ (wartość środkowa) wiąże się z wyraźnie wyższymi stężeniami TCa, CCa, HbA1c i TG, czego nie obserwowano u kobiet z wymienionej grupy u których stężenie BCAAs było niższe. Surowicze stężenia BCAA były istotnie związane z prawdopodobieństwem wystąpienia ocenianych czynników ryzyka kardiometabolicznego we wszystkich grupach, z wyjątkiem $\text{TC/HDL-C} > 4,5$ (grupa DG) oraz $\text{TC/HDL-C} > 4,5$, $\text{TG} > 1,7$, $\text{HbA1c} > 39$ oraz nadciśnienia lub leczenia nadciśnienia tętniczego (grupa NG), a każdy wzrost stężenia analizowanych aminokwasów o 10 $\mu\text{mol/L}$ zwiększał to prawdopodobieństwo. Pani Magister wykazała także, że w grupie kobiet z dysglikemią stężenie BCAA, TCa lub CCa oraz zmienna wiek były istotnie związane ze stężeniem HbA1c, niezależnie od wartości BMI. Zdaniem Autorki, umiarkowanie podwyższone wartości stężeń BCAA u chorych z hiperglikemią lub wzmożoną aktywnością stanu zapalnego mogą zaburzać przemiany glukozy, leżące u podstaw dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego, poprzez m. in. obniżanie progu fosforylacji kinazy serynowo-treoninowej (mTOR, *mammalian target of rapamycin*), będącej białkiem regulującym nasilenie wielu istotnych procesów wewnątrzkomórkowych, w tym – transkrypcji, translacji czy organizacji cytoszkieletu, jak i szlaków sygnalizacyjnych komórki związanych z insuliną i insulinopodobnymi czynnikami wzrostu 1 i 2. Doktorantka związała także powyższe patomechanizmy z wpływami zarówno reaktywnych form tlenu (RFT), jak i hiperkalcemii. Wiadomo bowiem, że nadmiar RFT sprzyja reakcji glikooksydacji, co może prowadzić do zwiększonej biosyntezy HbA1c i produktów końcowych zaawansowanej glikacji, zaś wysokie stężenia wapnia mogą sprzyjać dysfunkcji komórek β trzustki, jak i modulować ekspresję transportera glukozy typu 4.

W drugiej publikacji oryginalnej, pt. „The kynurenine pathway in obese middle-aged women with normoglycemia and type 2 diabetes”, z uwagi na zależne od stanu otyłości oraz czynników stymulujących

proces zapalny przemiany tryptofanu (Trp), Doktorantka, poddała ocenie związek wymienionego aminokwasu i jego metabolitów z szlaku kinureninowego (KP, *kynurenine pathway*) z czynnikami ryzyka kardiometabolicznego oraz T2D, u 128 otyłych kobiet, w tym – 65 kobiet z normoglikemią (NG) i 63 kobiet z T2D. Część badań stanowiących cel omawianej pracy wykonano, metodą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (UHPLC-ESI-MS/MS, *ultrahigh performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*), we współpracy z Pracownią Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego w Lublinie. Spośród ocenianych metabolitów tryptofanu, tj. kinureniny (Kyn, *kynurenine*), 3-hydroksykinureniny (3HKyn, *3-hydroxykynurenine*), kwasu kinurenowego (Kyna, *kynurenic acid*) i kwasu chinolinowy (QA, *quinolinic acid*), stężenia samego związku macierzystego, tj. Trp, i Kyna były istotnie wyższe we krwi kobiet z T2D w porównaniu do stężenia cechującego pacjentki z NG. Co więcej, w przebiegu cukrzycy Autorka stwierdziła występowanie istotnie wyższych wartości stosunków Kyna/QA oraz Kyna/3HKyn odzwierciedlających zachwianie równowagi między kinureninami, w przeciwieństwie do porównywalnych do grupy z NG wartości stosunków: Kyn/Trp (KTR) – który odzwierciedla aktywnośćIDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), Kyna/Kyn (KAT) – który odzwierciedla aktywność KAT (*kynurenine aminotransferase*), 3HKyn/Kyn (KMO) – który odzwierciedla aktywność KMO (*kynurenine-3-monooxygenase*). Co więcej, stężenia Trp i Kyna oraz wartość stosunku Kyna/3HKyn były zdaniem Doktorantki najsilniej związane z występowaniem T2D, natomiast bardziej nasilone związki pomiędzy stężeniem ocenianego aminokwasu i jego metabolitów a wartością BMI cechowały kobiety z normoglikemią. Jednakże, zdziwienie budzi brak związku pomiędzy Trp oraz wszystkimi jego pochodnymi a stężeniem HbA1c u badanych kobiet z obu grup. Stąd, uprzejmie zapytuję Doktorantkę o prawdopodobną przyczynę takiego zjawiska. Powyższe zapytanie wynika z faktu, że obie publikacje eksperymentalne wchodzące w skład analizowanej dysertacji są ubogacone w przemyślane dyskusje, w których Pani Magister nie odnosi swoich rezultatów badań wyłącznie do wyników innych autorów, lecz stawia odważne, choć wyważone hipotezy. Zatem lektura tych prac, które zostały opatrzone w liczne tabele i ryciny, stanowi dla czytelnika znaczną przyjemność. Wydaje się jednakże, że „wzmocnieniem” wyników pracy byłoby podzielenie grupy kobiet z cukrzycą na podgrupy uwzględniające zarówno czas trwania choroby (z opisu kryteriów włączenia wnioskuje, że były wśród kobiet chorych osoby ze świeżo rozpoznaną cukrzycą na podstawie dwóch niezależnych pomiarów glikemii na czczo, jak i osoby z cukrzycą już leczone), jak i stosowane leczenie (związek metforminy z przemianami aminokwasów został opisany – doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101750, [doi:10.1016/j.metabol.2013.07.003](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.07.003)).

Pani mgr Justyna Kubacka podsumowuje rezultaty swoich badań wskazując, że oznaczanie stężenia tryptofanu, metabolitów szlaku kinureninowego oraz aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach we krwi, mogą zostać wykorzystane jako potencjalne narzędzia diagnostyczne, prognostyczne lub rokownicze zaburzeń kardiometabolicznych, w tym – cukrzycy typu 2 u kobiet w średnim wieku. Jakie należy zatem wdrożyć działania, aby ocena ilościowa wymienionych parametrów, w łatwo dostępnym materiale biologicznym jakim jest krew, weszła do praktyki medycyny laboratoryjnej?

W podsumowaniu oświadczam, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska pt.: „Znaczenie wybranych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w średnim

wieku” jest oryginalnym, samodzielny dorobkiem naukowym Pani mgr Justyny Kubackiej, Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk medycznych. W recenzowanej pracy Doktorantka podjęła bardzo aktualną i istotną – z punktu widzenia postępowania diagnostycznego w chorobach cywilizacyjnych jakimi są cukrzyca typu 2 i zaburzenia sercowo-naczyniowe – tematykę, wykazała się wiedzą teoretyczną, znajomością warsztatu badawczego, technik analizy statystycznej i umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników.

Jednocześnie potwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Z pełnym przekonaniem przedkładam, Szanownym Członkom Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Justyny Kubackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej, doceniając nakład pracy i wyjątkowe walory poznawcze i praktyczne znaczenie otrzymanych przez Panią mgr Justynę Kubacką wyników badań, wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.

Sosnowiec 30 VI 2023o

Wiem - Sławo Isotajce