

Dr hab. n. med.

Łódź, dnia 08.11.2016 r.

Karina Wierzbowska-Drabik  
Katedra i Klinika Kardiologii  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
ul. Kniaziewicza 1/5

### Recenzja rozprawy doktorskiej

lekarza medycyny Pauliny Jackowskiej pt.:

*„Porównanie wpływu leczenia statyną w monoterapii i w terapii skojarzonej z ezetymibem na immunologiczne mechanizmy regulacyjne u pacjentów z chorobą wieńcową”*

Przedstawiona do oceny praca dotyczy bardzo ważnego poznawczo i klinicznie problemu patomechanizmu i skuteczności różnych schematów leczenia hipolipemizującego w chorobie wieńcowej w aspekcie wpływu na immunologiczne mechanizmy regulacyjne. Rolę odpowiedzi zapalnej, wrodzonych i nabytych reakcji immunologicznych podkreśla się w rozwoju miażdżycy tętnic od dawna, jednak precyzyjne wyjaśnienie postulowanych mechanizmów, ich znaczenia klinicznego i możliwości korzystnych modyfikacji terapeutycznych wymaga dalszych badań i przynosi wciąż nowe dane np. w kontekście wczesnego włączania wysokich dawek statyn w ostrych zespołach wieńcowych czy w przebiegu niedokrwienego udaru mózgu.

Celem badania jest porównanie trzech strategii leczenia o równoważnej sile hipolipemicznej: atorwastatyną, rozuwastatyną oraz terapii skojarzonej atorwastatyną z ezetymibem na ekspresję mRNA czynnika transkrypcyjnego limfocytów T-regulatorowych (T-reg) FoxP3 i IL-10 oraz na stężenie hsCRP u pacjentów z chorobą wieńcową. Jako drugi cel obrano ocenę korelacji między zmianami lipidogramu (po 1 i 6 miesiącach) a ekspresją mRNA FoxP3 i IL-10 w poszczególnych grupach pacjentów.

Z dotychczasowych badań wynika, że niedobór lub dysfunkcja limfocytów T-reg prowadzi do rozwoju nacieku zapalnego i blaszki miażdżycowej. Wpływ supresorowy komórek T-reg na rozwój miażdżycy jest wielokierunkowy i często przebiega z pośrednictwem IL-10 i TGF- $\beta$  np. poprzez hamowanie funkcji proaterogennych limfocytów Th1 i Th17 czy aktywacji komórek dendrytycznych i komórek śródbłonna. W tym ujęciu przyczyną rozwoju miażdżycy jest upośledzenie lokalnej tolerancji immunologicznej wynikające m.in. ze zmniejszonego odsetka limfocytów T-reg w blaszce w porównaniu z tkankami prawidłowymi lub zmianami zapalnymi skóry. Zmniejszona liczba komórek T-reg we krwi była też wiązana z częstszymi epizodami sercowo-naczyniowymi oraz ostrymi zespołami wieńcowymi.

Rozprawa lek. med. Pauliny Jackowskiej została przygotowana w typowym dla prac doktorskich układzie i obejmuje 7 rozdziałów, 113 stron tekstu, 23 tabele i 16 rycin oraz 161 pozycji piśmiennictwa. Czytelnik znajdzie w niej także Streszczenie w języku polskim i angielskim, informacje o źródłach finansowania badań oraz zamieszczoną jako załącznik zgodę Komisji Bioetyki co już w chwili pierwszego kontaktu z pracą daje poczucie staranności i profesjonalizmu.

Dość obszerny wstęp koncentruje się na aktualnych rekomendacjach i wynikach badań dotyczących atorwastatyny, rozuwastatyny i terapii skojarzonej statyną z ezetymibem a także charakterystyce limfocytów T regulatorowych (T reg) oraz ich roli w rozwoju miażdżycy i stanowi wartościowe wprowadzenie w tematykę pracy. Zwraca uwagę umiejętność selekcji prezentowanych informacji i komunikatywność stylu.

Na podkreślenie zasługują elementy nowatorskie podjętych analiz, uzasadnionych w szczególności brakiem badań oceniających wpływ ezetymibu na funkcję komórek T-regulatorowych oraz rozbieżnymi wynikami badań dotyczących właściwości immunomodulujących poszczególnych statyn.

Pomimo zwięźle sformułowanych celów, badanie zakładało szczegółowe analizy parametrów biochemicznych i immunologicznych w trzech punktach czasowych: w momencie randomizacji do różnych strategii leczenia a następnie po 30 oraz 180 dniach jego stosowania. Zaplanowano także odrębną wizytę poświęconą kwalifikacji i wstępnej ocenie pacjentów, udzieleniu szczegółowych informacji na



temat badań i leczenia oraz uzyskaniu świadomej zgody. Rozdział plan badania w syntetyczny sposób przedstawia kryteria włączenia i wyłączenia oraz procedury przewidziane w czterech etapach pracy, zwiększając przejrzystość części metodycznej.

Za cechę zwiększającą swoistość uzyskanych wyników dla pacjentów z klinicznie jawną chorobą wieńcową należy uznać zawężenie grupy do osób po przebytym zawale serca, przezskórnej interwencji wieńcowej lub pomostowaniu aortalno-wieńcowym oraz wyodrębnienie aż 20 merytorycznych kryteriów wykluczających minimalizujących potencjalny wpływ chorób współistniejących, czynników ryzyka i przyjmowanych leków na planowane analizy. Do badania zakwalifikowano 65 pacjentów, pełne dane uzyskując u 61 osób.

W części metodycznej przedstawiono szczegółowo procedury izolacji komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej, izolacji mRNA, odwrotnej transkrypcji i oceny ekspresji genów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), w której oznaczano tzw. cykl progowy (CT) pozwalający na ocenę ekspresji mRNA w badanej próbce i porównywano go z wartością CT dla genu referencyjnego wyznaczając wartość  $\Delta$ CT. Następnie określano zmianę  $\Delta$ CT w efekcie zastosowanej terapii. Realizacja przewidzianych analiz wymagała współpracy z Pracownią Immunopatologii i Genetyki przy Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W części poświęconej wynikom Autorka przedstawia charakterystykę pacjentów w poszczególnych wyodrębnionych drogą randomizacji grupach, leczonych odpowiednio atorwastatyną w dawce 40 mg/dobę (grupa A40), rozuwastatyną 20 mg/dobę (R20) oraz atorwastatyną z ezetymibem w dawkach po 10 mg (A10+E10), prezentując oprócz średnich i odchyłeń standardowych także wartości minimalne i maksymalne oraz medianę i kwartyle. Jedynym parametrem różnicującym grupy przed leczeniem było, jak podaje w tekście pracy Autorka, stężenie białka hsCRP. Po miesiącu leczenia, podobnie jak wyjściowo w grupie A40 obserwowany jest wyższy niż w grupie R20 poziom hsCRP. Co interesujące nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian poziomu hsCRP w przebiegu leczenia w żadnej z podgrup.

Po miesiącu leczenia stężenie cholesterolu we frakcji LDL (LDL-C) obniżyło się w całej grupie istotnie statystycznie o 25% a po 6 miesiącach o 26% w stosunku do wartości przed leczeniem, przy czym uzyskane średnie wartości parametrów lipidowych po 1 i 6 miesiącach nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Pomimo, że wartości liczbowe opisujące średnią ekspresję mRNA dla FoxP3 i IL-10 we wszystkich trzech grupach były większe po 1 i 6 miesiącach leczenia w stosunku do wartości wyjściowych, różnice te w żadnym porównaniu nie osiągnęły istotności statystycznej. W porównaniu pomiędzy poszczególnymi grupami stwierdzono istotnie wyższy poziom ekspresji mRNA dla czynnika transkrypcyjnego FoxP3 po 6 miesiącach wśród pacjentów leczonych atorwastatyną względem grupy leczonej rozuwastatyną, parametr ten w grupie terapii skojarzonej przyjął wartości pośrednie. Nie zaobserwowano różnic poziomu ekspresji mRNA dla FoxP3 i IL-10 u pacjentów z osiągniętym (21 osób) i nieosiągniętym stężeniem LDL cholesterolu <70 mg/dl (40 osób).

W analizie korelacji wielkość spadku LDL-C uzyskanego w trakcie terapii korelowała dodatnio z wyjściowym stężeniem LDL cholesterolu w całej grupie badanej oraz w większości podgrup. Nie obserwowano korelacji pomiędzy zmianami LDL a zmianami ekspresji FoxP3 i IL-10, stwierdzono natomiast dodatnią zależność pomiędzy przyrostami ekspresji mRNA dla obu markerów limfocytów T-reg w całej grupie badanej i części podgrup (R20 oraz A40 po 6 miesiącach).

Na końcu pracy sformułowano trzy wnioski odnoszące się do postawionych celów:

1. Porównywane terapie miały zbliżony wpływ stężenie na hsCRP a zróżnicowany odnośnie limfocytów T-reg u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową. Nie odnotowano istotnych przyrostów ekspresji mRNA w kolejnych punktach czasowych badania, po 6 miesiącach w grupie A40 ekspresja mRNA dla FoxP3 była wyższa niż w grupie R20 oraz obserwowano dodatnie korelacje między zmianami ekspresji FoxP3 i IL-10 w grupach leczonych rozuwastatyną i atorwastatyną.



2. Pomimo zbliżonej skuteczności hipolipemizującej najwyższy odsetek pacjentów, którzy osiągnęli docelowy poziom LDL odnotowano w grupie terapii skojarzonej.

3. Redukcja LDL-C u pacjentów leczonych statynami w monoterapii zależała od wyjściowego poziomu LDL.

W dyskusji na szczególne uznanie zasługuje precyzyjne i trafne określenie ograniczeń badania wraz z próbą naszkicowania kierunków dalszych badań. Warto zauważyć, że ostateczna kwalifikacja do badania niezbyt licznej grupy 65 pacjentów nastąpiła po skriningu wykonanym aż u 1100 pacjentów co potwierdza konsekwentne przestrzeganie przyjętych kryteriów i dowodzi rzetelności badawczej. Autorka prowadzi dyskusje ciekawie i prawidłowo dobiera cytowane piśmiennictwo, w większości pochodzące z ostatnich lat i ilustrujące nadal istniejące w opracowanym temacie kontrowersje.

Z obowiązku recenzenta pragnę zauważyć, że tabelę 13 zestawiającą średnie i odchylenia standardowe parametrów klinicznych i laboratoryjnych dla trzech grup warto byłoby uzupełnić o komentarz dotyczący istotności statystycznej obserwowanej różnicy, choć informacja ta pojawia się później ponownie już z wartością  $p=0,024$  w tabeli 23. Podobnie, z uwagi na złożoność zastosowanych metod wydaje się, że czytelność ich prezentacji zwiększyłoby dodatkowo dołączenie ryciny z algorytmem przyjętego postępowania. Uwagi te nie umniejszają jednak w niczym wysokiej wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując ocenę rozprawy lek. med. Pauliny Jackowskiej pragnę stwierdzić, że jest to bardzo dobrze zaplanowane badanie oryginalne poruszające aktualny i ważny poznawczo temat immunomodulującego wpływu leczenia hipolipemizującego u pacjentów z chorobą wieńcową. W badaniu podjęto się porównania trzech schematów leczenia, którego wpływ oceniano w trzech punktach czasowych badania co pomimo dość zwięzle napisanej rozprawy wskazuje na znaczny wkład pracy Doktorantki. Z uwagi na powszechność i długoterminowość stosowania statyn, ich rolę w redukcji śmiertelności sercowo-naczyniowej oraz potencjalne różnice w działaniu poszczególnych leków tej klasy stosowanych w

różnych dawkach pogłębianie wiedzy o ich działaniu ma także istotne implikacje dla praktyki klinicznej.

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego rozwiązania złożonego, interdyscyplinarnego problemu naukowego, posługując się rozbudowanym warsztatem metodycznym i licznymi analizami statystycznymi zrealizowała w pełni założone cele i potwierdziła swoje bardzo dobre przygotowanie teoretyczne w obranej tematyce i dyscyplinie naukowej.

Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z prośbą o dopuszczenie lekarza Pauliny Jackowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego a także o wyróżnienie przedstawionej rozprawy.

*dr hab. n. med.*  
*Karina Wierzbowska-Drabik*  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista kardiolog  
1751955

*Karina Wierzbowska-Drabik*