

Dr hab. n. med. Małgorzata Knapp

Klinika Kardiologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

malgo33@interia.pl

Białystok, 14. 09.2023.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Magdaleny Kopytek

Pt. „, Czynniki modulujące progresję stenozы aortalnej – związki z zapaleniem, aktywacją układu krzepnięcia/fibrynolizy i kalcyfikacją.”

Factors modulating the progression of aortic stenosis – association with inflammation, activation of the coagulation/fibrinolysis system and calcification.

Zwężenie zastawki aortalnej (stenoza aortalna, *aortic stenosis*, AS) jest najczęściej aktualnie diagnozowaną wadą nabytą serca u dorosłych, zwłaszcza w wieku podeszłym. Częstość występowania ciężkiej postaci AS u pacjentów w wieku powyżej 65 lat wynosi 3,4% (Osnabrugge RL et al. Aortic stenosis in the elderly. J Am Coll Cardiol 2013; 62:1002-12). Szacuje się, że do 2030 r. istotne zwężenie zastawki aortalnej zostanie zdiagnozowane u ok. 4,5 mln ludzi. Jedyną opcją leczenia to chirurgiczna lub przezskórna wymiana zastawki na protezę zastawkową.

Na przestrzeni lat zmieniały się koncepcje patogenezy AS. Uważano min., że jest ona tożsama z procesem powstawania blaszki miażdżycowej, między innymi na podstawie współlistnienia podobnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Jednakże hipoteza ta nie znalazła potwierdzenia w badaniach klinicznych. Obecnie wiadomo, że mechanizm powstawania zmian degeneracyjnych zastawki jest inny. Wynika z obecności komórek śródmiąższowych zastawki, które są źródłem wielu cytokin prozapalnych, przeciwzapalnych, czynników chemotaktycznych oraz proteinaz, które w sposób czynny modulują procesy zachodzące podczas rozwoju i progresji AS (Akerstrom F. et al. Aortic stenosis: a general overview of clinical, pathophysiological and therapeutic aspects. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2013; 11: 239-50. Liu AC et al. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. Am J Pathol.2007; 171: 1407-18.). Patomechanizm AS jest procesem złożonym i ściśle regulowanym, związanym z aktywacją wielu szlaków na poziomie molekularnym, komórkowym i tkankowym.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska składa się z 4 oryginalnych prac naukowych oraz jednej przeglądowej opublikowanych w prestiżowych czasopismach o łącznej punktacji MNiSW 660 i współczynniku oddziaływania (IF) 39,017. We wszystkich pracach oryginalnych doktorantka jest pierwszym autorem, w pracy przeglądowej drugim.

1. **Kopytek M**, Zabczyk M, Mazur P, Undas A, Natorska J *Accumulation of advanced glycation end products (AGEs) is associated with the severity of aortic stenosis in patients with concomitant type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol. 2020; 19:92. (IF= 9,951, MNiSW 140pkt)

2. **Kopytek M**, Mazur P, Zabczyk M, Undas A, Natorska J. *Diabetes concomitant to aortic stenosis is associated with increased expression of NF- κ B and more pronounced valve calcification*. Diabetologia 2021;64:2562-2574. (IF=10,460, MNiSW=140 pkt.)

3. **Kopytek M.**, Ząbczyk M, Mazur P, Siudut J, Natorska J. *Oxidized phospholipids associated with lipoprotein(a) contribute to hypofibrinolysis in severe aortic stenosis*. Pol Arch Intern Med. 2022; 132: 16372. (IF=5,218; MNiSW=140 pkt.)
4. **Kopytek M.**, Ząbczyk M, Mazur P, Undas A, Natorska J. *PAI-1 Overexpression in Valvular Interstitial Cells Contributes to Hypofibrinolysis in Aortic Stenosis*. Cells. 2023; 12: 1402 (IF=7,666; MNiSW=140 pkt.)
5. Natorska J, **Kopytek M.**, Undas A. *Aortic valvular stenosis: Novel therapeutic strategies*. Eur J Clin Invest. 2021; 51: e13527 (IF=5,722; MNiSW=100 pkt.)

Należy podkreślić, że prace zostały opublikowane w uznanych i cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, co potwierdza dużą wartość i znaczenie przedstawionych w rozprawie doktorskiej badań naukowych.

Rozprawa doktorska liczy ogółem 120 stron i ma typowy układ – składa się ze standardowych rozdziałów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Uzupełniona jest o wykaz skrótów, kserokopii wymienionych publikacji oraz oświadczenia Doktorantki oraz współautorów prac o wkładzie własnym w powstanie publikacji.

Celem pracy było badanie mechanizmów związanych z działaniem czynników modulujących progresję AS, tj. hiperglikemii i nasilonego stresu oksydacyjnego ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnych związków z zapaleniem, aktywacją układu krzepnięcia, hipofibrinolizą i kalcyfikacją u pacjentów z istotnym zwężeniem zastawki aortalnej.

Doktorantka wysunęła następujące hipotezy:

1. Zwiększona akumulacja końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGI)s u pacjentów z AS i współistniejącą cukrzycą 2 (DMt2) jest związana ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS) i wapnieniem zastawki.
2. DMt2 współistniejąca z AS wiąże się ze zwiększoną ekspresją jądrowego czynnika kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), aktywacją układu krzepnięcia *in loco* oraz nasilonym wapnieniem zastawki.
3. Podwyższony poziom utlenionych fosfolipidów (OxPL) w surowicy krwi jest nowym czynnikiem determinującym hipofibrinolizę u pacjentów z ciężką AS.
4. U pacjentów z ciężką AS akumulacja lipidów w obrębie stenotycznych zastawek prowadzi do nadekspresji inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1), co przyczynia się do hipofibrinolizy.

Do **pierwszego** z badań stanowiących cykl publikacji włączono 126 chorych z istotnym zwężeniem zastawki aortalnej, z czego 50 miało współistniejącą cukrzycę (AS-DM). Pacjenci z AS-DM mieli istotnie nasiloną kumulację AGI)s w stenotycznych zastawkach (wzrost 6.6-krotny) i 12-krotny wzrost w surowicy oraz istotnie wyższą ekspresję rozpuszczalnej formy receptora dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE) w stosunku do chorych bez współistniejącej DM. Wyniki korelowały ze stopniem wyrównania cukrzycy oraz zaawansowaniem wady aortalnej. Na podstawie osiągniętych wyników wysunięto przypuszczenie, że stopień degeneracji płatków zastawki aortalnej u pacjentów z współistniejącą DMt2 jest wynikiem związanego z akumulacją AGI)s usieciowania zastawkowego kolagenu, co prowadzi do nasilonego stanu zapalnego, aktywacji układu krzepnięcia i w konsekwencji do wapnienia płatków zastawki. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze badania wykonywane na modelach zwierzęcych. Badanie przeprowadzone przez Doktorantkę wraz z Zespołem sugeruje, że u pacjentów z AS i współistniejącą DMt2

akumulacja AGEs i RAGE może mieć wpływ na tempo progresji wady, a utrzymanie HbA1C i/lub fruktozaminy w zakresie norm referencyjnych może spowolnić tempo choroby.

Wątek wpływu hiperglikemii na wapnienie zastawki kontynuowano w **publikacji 2**.

Wykazano w niej, że chorzy z ciężką AS i współistniejącą DM2 wykazują zwiększoną zastawkową ekspresję jądrowego czynnika kappa (NF- κ B) w połączeniu z nasiloną in loco ekspresją BMP-2 (białka morfogenetycznego kości). Słabo kontrolowana cukrzyca wiązała się ze zwiększoną ekspresją badanych markerów. Pacjenci z grupy AS-DM mieli znacznie wyższe stężenie kompleksu czynnika VII aktywnego i antytrombiny w osoczu krwi.

Zaobserwowano, że hiperglikemia jest czynnikiem prozapalnym dla komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej (VICs), a źle kontrolowana cukrzyca jest związana ze stanem prozakrzepowym, który może wpływać na progresję wady zastawki aortalnej. Dane te są spójne z wynikami **publikacji 1** i potwierdzają hipotezę, że utrzymywanie parametrów długoterminowej kontroli glikemii w zakresie wartości referencyjnych może mieć kluczowe znaczenie w opóźnianiu progresji AS ze współistniejącą DM2. Zaobserwowano, że hiperglikemia nasila stres oksydacyjny i prowadzi do zwiększonej akumulacji AGEs i RAGE oraz wzmożonego usieciowania zastawkowego kolagenu, co nasila stan zapalny i aktywację układu krzepnięcia w obrębie płatków zastawki. Procesy te prowadzą do zwiększonej produkcji BMP-2 i szybszego wapnienia płatków zastawki.

W **publikacji 3** oceniano stężenia utlenionych fosfolipidów (OxPL), antygeny inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI) w zależności od stężenia lipoproteiny (a) (Lp(a)). Wyższe poziomy OxPL determinowały wydłużenie czasu lizy skrzepu (CLT) u pacjentów z AS i Lp(a)>50 mg/dl. Stężenie OxPL było niezależnym predyktorem CLT.

Celem kolejnej pracy było zbadanie, czy u pacjentów z ciężką AS nagromadzenie się lipidów w obrębie stenotycznych zastawek prowadzi do nadekspresji PAI-1, która nasila procesy

związane z hipofibrynolizą i progresją wady. W wyniku przeprowadzonych badań, stwierdzono, że w grupie z istotną AS, PAI-1 jest obficie uwalniany z komórek śródmiaższowych zastawki. Wynika to najpewniej z przewlekłego procesu zapalnego spowodowanego przez LDL. Nadekspresja PAI-1 prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy, co wpływa na stopień dysfunkcji zastawki aortalnej i progresję wady.

Ostatnią z prac włączonych do cyklu składającego się na rozprawę doktorską jest praca przeglądową omawiającą najnowsze potencjalne strategie terapeutyczne hamujące progresję AS.

Z przedstawionego cyklu publikacji wyciągnięto następujące wnioski:

- a) Złe kontrolowana DMt2 prowadzi do akumulacji AGEs w zastawkach aortalnych, przez co nasila lokalny stres oksydacyjny i zapalenie, który to proces w konsekwencji może prowadzić do szybszej progresji AS
- b) Cukrzyca t2 współistniejąca z AS nasila lokalny stan zapalny, aktywację układu krzepnięcia oraz syntezę mediatorów wapnienia zastawki poprzez nasiloną in loco aktywację NF- κ B.
- c) U pacjentów z AS i DMt2 utrzymywanie poziomu HbA1c i fruktozaminy w zakresie norm referencyjnych może spowolnić tempo progresji AS.
- d) U pacjentów z istotnym zwężeniem zastawki aortalnej oraz stężeniem Lp(a)>50 mg/dl obserwuje się podwyższone poziomy OxPL, które mają silniejszy wpływ na hipofibrynolizę niż Lp(a)
- e) U pacjentów z ciężką AS akumulacja lipidów prowadzi do nadekspresji PAI-1, wynikającej z nadmiernej aktywacji szlaku NF- κ B w zastawkach aortalnych, co przyczynia się do hipofibrynolizy.

Doktorantka zamieściła również obszerną, niezwykle ciekawą dyskusję, w której uzyskane wyniki omawia w aspekcie danych z piśmiennictwa światowego. Należy z całą mocą podkreślić, że uzyskane przez Nią wyniki mają charakter niezwykle nowatorski. Dotyczy to zwłaszcza publikacji 3 i 4.

W rozdziale „Ograniczenia” Doktorantka krytycznie odniosła się do niektórych aspektów swojej dysertacji. Dotyczy to między innymi ilości pacjentów włączanych do poszczególnych badań. Jednakże badania miały odpowiednią moc i reprezentują typowych pacjentów, z którymi mamy do czynienia w codziennej praktyce. Mgr Magdalena Kopytek odnosi się również do wpływu stosowanego leczenia, min. metforminy czy leków hipotensyjnych na uzyskane wyniki. Analizuje także metody badań laboratoryjnych, np. podnosi kwestię ewentualnej modyfikacji warunków hodowli komórek śródmiąższowych. W zaprezentowanych badaniach różniły się także nieznacznie kryteria rozpoznawania wady w zależności od aktualnych standardów.

Mgr Magdalena Kopytek opisuje również perspektywy wynikające z przeprowadzonych przez siebie badań. Aktualnie standardem postępowania w przypadku chorych z ciężkim zwężeniem zastawki aortalnej jest leczenie zabiegowe metodą chirurgiczną lub przezskórną. Przedstawione wyniki pokazują wyraźnie w jaki sposób, poprzez dobre wyrównanie chorób współistniejących, można spowolnić progresję choroby. Coraz więcej danych wskazuje również, że terapie ukierunkowane na obniżenie poziomu OxPL mogą w przyszłości mieć znaczenie w opóźnianiu rozwoju AS. Istotny wpływ ma również zastosowanie doustnych antykoagulantów nie będących antagonistami witaminy K (NOAK). Wpływają one nie tylko na układ krzepnięcia, ale również na proces zapalny i przebudowę zastawek. Również

inhibitory szlaku NF- κ B badane przez Doktorantkę mogą być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu AS, poprzez hamowanie zapalenia i promowanie fibrynolizy. Wprowadzenie tego typu farmakoterapii byłoby krokiem milowym w leczeniu chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej.

Podsumowując – rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Kopytek pt. „Czynniki modulujące progresję stenozy aortalnej – związki z zapaleniem, aktywacją układu krzepnięcia/fibrynolizy i kalcyfikacją.” (Factors modulating the progression of aortic stenosis – association with inflammation, activation of the coagulation/fibrinolysis system and calcification.) jest niezwykle ciekawa i nowatorska. Niesie za sobą implikacje co do potencjalnego rozwoju farmakoterapii zwężenia zastawki aortalnej. Dysertacja spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie lek. Magdaleny Kopytek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na znaczące aspekty poznawcze i praktyczne przeprowadzonych badań przedkładam wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Dr hab., n. med. Małgorzata Knapp

