

Prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski  
I Katedra i Klinika Kardiologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauka medycznych lekarza Beaty Małkowskiej pt.:  
„Ocena nosicielstwa mutacji genów wrodzonej trombofilii F2, F5, MTHFR w populacji  
chorych z przebyłym w młodym wieku zawałem mięśnia sercowego”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarza Beaty Małkowskiej to oryginalne retrospektywne badanie, oceniające częstość występowania mutacji w genach F2, F5 i MTHFR w populacji młodych pacjentów (<50 roku życia) po przebyłym zawałe serca oraz ich wpływ na ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych w odniesieniu do klasycznych czynników ryzyka choroby wieńcowej.

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia choroba niedokrwienna serca odpowiada za 16% wszystkich zgonów na świecie, jednakże znaczenie poszczególnych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych nie jest w pełni określone. Najbardziej popularną klasyfikacją klasycznych, znanych od dawna, czynników ryzyka jest podział na modyfikowalne (wiek, płeć, wywiad rodzinny) i niemodyfikowane (nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe, nadwaga, złe nawyki żywieniowe, nikotynizm, niska aktywność fizyczna, czynniki psychospołeczne czy nadmiar alkoholu). Przedmiotem badań pozostają także nieklasyczne, nowe, czynniki ryzyka, do których możemy zaliczyć między innymi stany prozakrzepowe. Ich występowanie, wg triady Virchowa opisaney w 1866 roku, jest zjawiskiem wieloczynnikowym zależnym od współistnienia urazu ściany naczynia krwionośnego, zaburzenia przepływu krwi czy wreszcie nadmiernej krzepliwości krwi. Obecnie, w kontekście zakrzepicy tętniczej, zwraca się uwagę na złożoność interakcji pomiędzy stanem śródbłonna (mediowanym przez zapalenie i miażdżycę) a uogólnioną nadkrzepliwością – tzw. trombofilią. Znaczenie trombofilii w powstawaniu zaburzeń neurologicznych czy niepowodzeniach położniczych znajduje swoje odzwierciedlenie we wskazaniach do badań dodatkowych w ich kierunku sformułowanych przez Grupę ds. Hemostazy Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów z 2022 roku. Wciąż brakuje jednak danych na temat zależności pomiędzy poszczególnymi trombofiliami a zawałem mięśnia sercowego. Podjęcie przez Kandydatkę tematu badawczego szczegółowej charakterystyki laboratoryjnej, klinicznej, echokardiograficznej oraz

postępowania terapeutycznego i rokowania w zależności od występowania wrodzonych trombofilii jest ważne w aspekcie naukowym i wychodzi naprzeciw aktualnym potrzebom klinicznym.

We wstępie Autorka przejrzysty sposób przedstawia epidemiologię, patofizjologię i kliniczną klasyfikację zawału mięśnia sercowego. Podkreśla znaczenie klasycznych czynników ryzyka w występowaniu chorób sercowo-naczyniowych, a następnie przechodzi do omówienia nowych czynników ryzyka. Zgodnie z tematem swojej pracy skupia się na trombofilii omawiając wskazania różnych towarzystw naukowych do przeprowadzenia diagnostyki w ich kierunku oraz wpływ wyników tych badań na dalsze postępowanie z pacjentem. Rozdział ten jest zwięzły, spójny i dobrze wprowadza do kolejnych rozdziałów rozprawy doktorskiej oraz wskazuje na uporządkowaną wiedzę autora w zakresie podjętej tematyki badawczej.

Założenia i cele pracy zostały jasno sformułowane. Do głównych celów pracy należało: 1) ocena częstości występowania mutacji w genach F2, F5 i MTHFR w grupie badanej i kontrolnej; 2) ocena korelacji mutacji z klasycznymi czynnikami ryzyka oraz 3) określenie znaczenia wywiady rodzinnej na stratyfikację ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych w grupie nosicieli poszczególnych mutacji.

Badanie miało charakter retrospektywny. Analizą objęto 118 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Kardiologii USK w Białymstoku z powodu ostrego zespołu wieńcowego poniżej 50 roku życia (grupa badawcza) oraz 118 zdrowych dorosłych z terenu województwa podlaskiego w wieku poniżej 50 lat (grupa kontrolna). Dokumentacja pacjentów z grupy badawczej została poddana analizie pod kątem: wieku, płci, BMI, chorób współtowarzyszących (cukrzyca, choroba nerek, nadciśnienie tętnicze), przebytych operacji, urazów, unieruchomienia. Dodatkowo pod uwagę wzięte zostały wyniki badań laboratoryjnych (kreatynina, lipidogram, glikemia) oraz obrazowych (echokardiografia i koronarografia). Wywiad został poszerzony o ankietę dotyczącą rodzinnej historii chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów, incydentów zakrzepowo-zatorowych. U wszystkich osób włączonych do badania wykoane zostały oznaczenia genetyczne metodą real-time PCR, służące wykryciu patogennych wariantów czynnika II (F2) i czynnika V (F5) krzepnięcia oraz warianty polimorficzne w genie MTHFR. W analizie statycznej wykorzystano analizę U Manna Whitney'ego, wariacji Kruskala-

Wallisa, oraz testem dokładnym Fishera odpowiednio dla zmiennych ciągłych i kategoriycznych. Regresja logistyczna została wykorzystana, aby ocenić wpływ czynników ryzyka na wystąpienie kolejnego zawału serca. Wybrane metody statyczne można uznać za prawidłowe i uzasadnione.

Wyniki Autorka przedstawiła w formie opisowej, tabel i rycin. Rozdział ten oceniam jako starannie przygotowany i klarownie przedstawiony. W grupie badawczej przeważali mężczyźni (82%), a średnia wieku wynosiła 43 +/- 6 lat. Zawał z uniesieniem odcinka ST rozpoznano u 74 pacjentów; zawał bez uniesienia odcinka ST u 38 osób, natomiast u 6 osób dokumentacja medyczna nie była wystarczająca do zakwalifikowania typu zawału. Koronarografię wykonano u łącznie 91 osób, spośród których: 75 poddano angioplastyce wieńcowej, 1 osobę skierowano do leczenia kardiochirurgicznego, a u pozostałych osób stosowano leczenie zachowawcze. Patogeny wariant genu czynnika II (F2 – protrombiny) został zidentyfikowany u 3 chorych z zawałem serca i 4 osób z grupy kontrolnej ( $p=1.000$ ). Podobnie, brak istotnej statycznie różnicy w częstości występowania mutacji w genie czynnika V ( $p=0.339$ ). Nie zostały także stwierdzone różnice w rozkładzie mutacji w genie MTHFR pomiędzy grupami badawczą a kontrolną. Co ciekawe, współistnienie dwóch lub więcej mutacji w badanych genach było obserwowane częściej w grupie badawczej niż kontrolnej ( $p=0.036$ ). W dalszych podrozdziałach prezentowane porównania poszczególnych wariantów genetycznych w odniesieniu do klasycznych czynników ryzyka. Wykonane analizy wskazują, że warianty te nie mają istotnego związku z płcią, BMI, profilem lipidowym, cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, paleniem papierosów. Warianty genetyczne w analizowanych loci nie były także związane z obraną strategią leczenia. Ważnym wynikiem przeprowadzonych badań brak związku występowania mutacji w powyższych loci z wywiadem rodzinnym w kierunku chorób sercowo—naczyniowych.

Na podstawie uzyskano wyników lek. Beata Małkowska postawiła następujące wnioski:

1. Częstość występowania mutacji w genach F2, F5 i MTHFR w populacji pacjentów, którzy doświadczyli zawału przed 50 rokiem życia nie różni się od ich populacyjnej częstości.
2. Brak jednoznacznego związku mutacji w genach F2, F5 i MTHFR z klasycznymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego.

3. Nie stwierdzono związku żadnego z badanymi wariantów patogennych i polimorficznych a występowaniem obciążonego wywiadu rodzinnego w kierunku zawałów mięśnia sercowego.

Tak sformułowane wnioski wynikają z uzyskanych wyników i stanowią odpowiedź na postawione cele badawcze.

Dyskusja jest napisana poprawnie. Autorka właściwie przedstawia wyniki w kontekście dostępnej literatury. Rozdział ten wskazuje na rzetelność naukową Doktorantki oraz właściwe zachowanie krytycyzmu wobec własnych obserwacji. Na szczególną uwagę podniesienie w dyskusji ograniczonej użyteczności testów genetycznych w kierunku wrodzonych trombfilii jako narzędzia identyfikacji czynnika ryzyka sercowo-naczyniowego. Doktorantka słusznie zauważa, że predyspozycje genetyczne wynikają z dziesiątek, o ile nie setek czy tysięcy, loci – na które ostatecznie największy wpływ mają właśnie modyfikowalne aspekty stylu życia.

Pomimo wymienionych powyżej niekwestionowanych walorów poznawczych, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma kilka ograniczeń.

1. Najważniejszym jest oczywiście retrospektywny i obserwacyjny charakter badania. Ponadto, grupa badawcza – co Autorka sama zauważa – jest stosunkowo mała. Może to ograniczać moc statyczną testów. Natomiast, spośród cytowanych prac znajdują się badające populacyjne występowanie poszczególnych wariantów genetycznych, które mogły zostać wykorzystane do obliczenia wymaganej w badaniu wielkości próby.
2. Rozdział opisujący metody statyczne pomija wpływ rozkładu normalnego na wybór testu statycznego. Wszystkie zmienne ciągłe zostały porównane testami U Manna Whitney'a lub wariancji Kruskala-Wallisa. Czy to znaczy, że żadne ze zmiennych ciągłych nie spełniały warunków rozkładu normalnego?
3. Charakterystyka kliniczna grupy kontrolnej powinna zostać zestawiona z grupą badawczą. W podrozdziale 1.2 wyników zawarta jest jedynie informacja odnośnie rozkładu płci i wieku. Optymalnym rozwiązaniem byłoby dobranie grupy kontrolnej do badawczej za pomocy techniki *propensity-score matching*.
4. W podrozdziale 3.8 wyników prezentowana jest analiza jednoczynnikowej regresji logistycznej, gdzie predyktorem jest występowanie wszystkich czynników ryzyka.

Walory pracy zostałyby znacznie podniesione w momencie przeprowadzenia analizy wieloczynnikowej, gdzie każdy czynnik ryzyka byłby osobnym predyktorem, a do modelu zostało włączone współwystępowanie odpowiednio jednej, dwóch lub trzech mutacji. Rozwinęłyby to ciekawy wątek z rozdziału 2.4, gdzie pokazano większą częstość współistnienia mutacji w grupie badanej. Dodatkowo, jeżeli punktem końcowym było wystąpienie kolejnego zawału serca, należałoby podać długość obserwacji i wykorzystać narzędzie statyczne uwzględniające czas w obserwacji (np. model proporcjonalnego hazardu Cox'a).

Wymienione powyżej uwagi nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy, która niewątpliwie stanowi znaczący i w pełni oryginalny wkład w ocenę udziału wrodzonych trombofilii w kształtowaniu ryzyka sercowo-naczyniowego. W mojej ocenie rozprawa doktorska pt.: „Ocena nosicielstwa mutacji genów wrodzonej trombofilii F2, F5, MTHFR w populacji chorych z przebyłym w młodym wieku zawałem mięśnia sercowego” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Dlatego zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenia lekarza Beaty Małkowskiej do etapów dalszych przewodów doktorskiego.

Warszawa 30.08.2022

prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski

5775048  
prof. dr hab. n. med.  
**Marcin Grabowski**  
specjalista chorób wewnętrznych  
kardiolog, hipertensjolog