

Dr hab. n. med. Mateusz Tajstra  
III Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu  
Ul. M.C. Skłodowskiej 9  
41-800 Zabrze

Zabrze, 16.08.2023 r

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Bartosz Sosnowski

**„Ocena białka Klotho i FGF23 w surowicy pacjentów z niewydolnością serca z uwzględnieniem jej etiologii oraz stopnia zaawansowania”**

z Uniwersytetu Medycznego  
w Białymstoku

Kliniki Kardiologii Inwazyjnej z OIOK i Pracownią Hemodynamiki  
Pod przewodnictwem Pana Profesora Sławomira Dobrzyckiego

## **Wprowadzenie do recenzji**

Pomimo znaczącego postępu medycyny, niewydolność serca (HF-heart failure) nadal stanowi olbrzymie wyzwanie diagnostyczne, terapeutyczne i ekonomiczne. Szacuje się, iż ponad milion Polaków cierpi z powodu HF. Zaostrzenia/dekompensacje HF pozostają olbrzymim obciążeniem dla budżetu ochrony zdrowia. Powszechnie uznaje się, że HF stanowi epidemię naszych czasów. Dlatego też, środowisko naukowe zajmujące się schorzeniami sercowo-naczyniowymi intensywnie poszukuje nowych możliwości zwłaszcza w obszarze prewencji, nowych markerów ryzyka rozwoju i/lub progresji oraz innowacyjnych postępowań terapeutycznych w obszarze HF. Towarzystwa naukowe intensywnie śledzą pojawiające się dane w tym zakresie, czego wyrazem są relatywnie częste aktualizacje wytycznych dotyczących postępowania w HF.

Należy odnotować, iż pojawiły się doniesienia wskazujące istotną interakcję między nowymi markerami: białkiem Klotho (ang. *Klotho protein*, KL) i czynnikiem wzrostu fibroblastów 23 (ang. *fibroblast growth factor 23*, FGF-23), a patogenezą przewlekłej choroby nerek i chorób układu sercowo-naczyniowego. Ponad to, wykazano możliwą zależność pomiędzy podwyższonym stężeniem FGF-23, a rozwojem: nadciśnienia tętniczego, migotania przedsionków, choroby wieńcowej, udaru niedokrwinnego mózgu oraz niewydolności serca oraz ścisłą korelację między wyższym stężeniem KL w surowicy, a poprawą rokowania z przyczyn sercowo-naczyniowych.

Powyższe fakty pozwoliły Doktorantowi na postawienie tezy naukowej, że ocena stężeń markerów: KL i FGF-23 u chorych z rozpoznaniem HF, może mieć znaczenie kliniczne, w aspekcie zmiany paradygmatu stratyfikacji ryzyka w tej grupie pacjentów.

Weryfikacja takiej hipotezy wydaje się być ciekawa, a temat, którego opracowaniem zainteresował się Doktorant uważam za ważny i potrzebny z punktu widzenia codziennej praktyki klinicznej.

## **Omówienie rozprawy doktorskiej**

Rozprawa, którą przedstawiono mi do recenzji ma układ typowy, liczy 98 stron, zawiera 20 rycin i 23 tabel oraz odnosi się do 181 pozycji aktualnego piśmiennictwa.

Zawiera również skan zgody Komisji Bioetycznej. Praca przygotowana jest starannie i przejrzysto, napisana poprawnym i komunikatywnym językiem. Rozprawa doktorska jest opracowaniem jednośrodkowym, prospektywnym obejmującym grupę badaną kolejnych 250 pacjentów z rozpoznaniem HF oraz grupę kontrolną 20 chorych bez niewydolności serca, a prezentowane wyniki obejmują okres wewnątrzszpitalny jak również okres odległy, w którym oceniano częstość zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i ogólnych.

**Tytuł pracy** jest zgodny z treścią rozprawy.

**Wstęp** jest obszerny i dobrze uzasadniony merytorycznie. Stanowi on wartościowy element rozprawy i doskonale wprowadzenie do poruszanych w pracy zagadnień. Wskazuje on bardzo dobrą znajomość przez Autora problematyki związanej z omawianym tematem. Rozdział ten prowadzi płynnie i logicznie do uzasadnienia podjętego celu badań.

### **Cele pracy**

Celem pracy była: *„była analiza zależności stężenia białka Klotho i czynnika wzrostu fibroblastów 23 w surowicy pacjentów z rozpoznaniem niewydolności serca”*. Do realizacji powyższego celu Doktorant sformułował cele szczegółowe:

1. *„Ocena stężenia białka Klotho i czynnika wzrostu fibroblastów 23 w surowicy pacjentów z niewydolnością serca w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz typu rozpoznanej niewydolności serca.*
2. *Ocena stężenia białka Klotho i czynnika wzrostu fibroblastów 23 w surowicy pacjentów z niewydolnością serca w zależności od jej etiologii (choroba niedokrwienność serca, wady zastawkowe, kardiomiopatia rozstrzeniowa).*
3. *Badanie wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniem białka Klotho i czynnika wzrostu fibroblastów 23 w surowicy pacjentów z niewydolnością serca a wybranymi parametrami klinicznymi, laboratoryjnymi i echokardiograficznymi*
4. *Analiza śmiertelności pacjentów uczestniczących w badaniu w okresie obserwacji odległej”*.

### **Materiał i metodyka**

Autor analizą objął łącznie 250 kolejnych pacjentów (192 mężczyzn i 58 kobiet) z rozpoznaniem HF, hospitalizowanych w jednym Ośrodku w okresie od stycznia do lipca 2016 roku. Mediana wieku w grupie badanej wynosiła 71 (62-77) lat, zaś mediana LVEF - 40 (30-46) %. Grupę kontrolną stanowiło 20 pacjentów (16 mężczyzn i 4 kobiety), którzy nie spełniali kryteriów rozpoznania HF oraz kryteriów wyłączenia z badania. Mediana wieku w grupie kontrolnej wynosiła 63,5 (56,5-70,25) lat, mediana LVEF wynosiła 55 (52,25-60) %.

Wyjściowo dokonano analizy porównawczej grupy badanej i kontrolnej. Następnie, zgodnie z założonymi celami szczegółowymi pracy chorych podzielono na 3 podgrupy w zależności od stwierdzonej echokardiograficznie wartości LVEF: grupa I - 46 (HFpEF); grupa II - 68 chorych (HFmEF); grupa III - 136 chorych (HFrEF). W kolejnym etapie, grupę badaną podzielono na trzy podgrupy, w zależności od etiologii HF: wieńcowa (146 chorych), zastawkowa (34 chorych), na tle DCM (28 chorych) - 46 pacjentów o mieszanej i niejasnej etiologii HF została wyłączona z tej części analizy.

U każdego pacjenta wykonano ocenę kliniczną, badania laboratoryjne, ocenę EKG i UKG oraz inwazyjną ocenę tętnic wieńcowych, zgodnie z wytycznymi ESC. Oznaczenia stężenia KL oraz fragmentu C-końcowego FGF-23 (ang. *C-terminal FGF-23*, cFGF-23) w surowicy krwi obwodowej, przeprowadzone zostały metodą immunoenzymatyczna ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), przy użyciu komercyjnych testów tj. odpowiednio: Human soluble  $\alpha$ -Klotho Assay Kit (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Japan) oraz Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit (Immutopics, San Clemente, CA, USA), zgodnie z instrukcjami producenta.

W obserwacji odległej oceniano śmiertelność całkowitą oraz sercowo-naczyniową. Dane uzyskano z bazy Wydziału Udostępniania Danych i Certyfikacji Departamentu Systemów Państwowych Ministerstwa Cyfryzacji w Warszawie. Zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych zdefiniowano zgodnie z Międzynarodową Klasyfikacją Chorób ICD-10 jako rozpoznanie z zakresu I.XX.

Metody użyte do analiz statystycznych zostały dobrze dobrane i nie budzą zastrzeżeń.

### **Najważniejsze uzyskane wyniki**

Uzyskane przez Doktoranta wyniki wykazały, iż mediana stężenia FGF-23 w grupie badanej była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie kontrolnej. Natomiast, mediana stężenia białka Klotho była niższa numerycznie w grupie badanej, jednak obserwowana różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ( $p=0,32$ ).

Zarejestrowano brak różnic stężeń KL i FGF-23 w grupach chorych stratyfikowanych na podstawie wartości frakcji wyrzutowej lewej komory (HF<sub>r</sub>EF vs HF<sub>m</sub>EF vs HF<sub>p</sub>EF). Podobnie nie odnotowano istotnych różnic stężeń KL pomiędzy grupami w zależności od etiologii HF. Natomiast stężenie FGF-23 było najwyższe w grupie pacjentów z HF o etiologii zastawkowej, z graniczną wartością istotności statystycznej ( $p=0.059$ ).

W analizie zależności pomiędzy stężeniem FGF-23 w surowicy, a wybranymi parametrami klinicznymi, biochemicznymi i echokardiograficznymi wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia FGF-23 w surowicy częściej występowało migotanie przedsionków i przewlekła choroba nerek (w obu przypadkach  $p<0,001$ ) oraz istotnie wzrastało stężenie BNP ( $p<0,001$ ) i kreatyniny ( $p<0,001$ ). Wykazano, że wzrastające stężenia FGF-23 w poszczególnych kwartylach, korespondowały także ze stopniową redukcją stężenia białka Klotho ( $p=0,028$ ) oraz wartości wskaźnika GFR ( $p<0,001$ ).

W obserwacji odległej średni czas obserwacji grupy badanej ( $N=250$ ) wyniósł 1681 dni ( $SD=846$  dni), natomiast mediana – 2010 (954-2425) dni. Liczba pacjentów utraconych z obserwacji (*lost to follow-up*) wyniosła 42 (17,2%). Średni czas obserwacji grupy kontrolnej ( $N=20$ ) wyniósł 2195 dni ( $SD=446$  dni), natomiast mediana – 2375 (2164-2428) dni. W grupie tej nie odnotowano pacjentów utraconych z obserwacji.

Śmiertelność całkowitą oraz sercowo-naczyniową oceniono na dzień 31.12.2022 roku. W grupie badanej odnotowano łącznie 69 zgonów (33,33%), w tym 49 zgonów (71,01%) z przyczyn sercowo-naczyniowych. W grupie kontrolnej zarejestrowano jeden przypadek zgonu z przyczyny niezwiązanej z CVD.

Analiza w oparciu o kwartyle stężenia białka Klotho w surowicy, nie wykazała istotnych statystycznie różnic częstości występowania zgonów, w tym zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, pomiędzy poszczególnymi kwartylami.

Analiza w oparciu o kwartyle stężenia FGF-23 w surowicy, wykazała, że wysokie stężenia FGF-23 korespondowały z największą częstością zgonów, w tym zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych. Na podstawie modelu regresji proporcjonalnego hazardu Coxa, wykazano, że pacjenci z najwyższymi wartościami

stężenia FGF-23 w surowicy (kwartyl czwarty) charakteryzowali się ponad 8-krotnie wyższym ryzykiem zgonu w porównaniu z pacjentami z kwartyła pierwszego (HR=8,864; 95%CI: 3,094-25,393; p<0,0001). Wysokie ryzyko zgonu utrzymywało się także w modelu skorygowanym o wiek oraz wartość LVEF i GFR (HR=7,150; 95%CI: 2,438-20,974; p<0,0001).

Na podstawie przeprowadzonej analizy krzywych ROC wykazano wysoką zdolność dyskryminacyjną stężenia FGF-23 w surowicy (AUC=0,752; 95%CI: 0,672-0,832; p<0,0001), najwyższą w grupie chorych z rozpoznaniem istotnej wady zastawkowej serca (AUC=0,846; 95%CI: 0,703-0,989; p<0,0001).

Nie stwierdzono wartości predykcyjnej stężenia białka Klotho w surowicy dla przewidywania wystąpienia zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych w grupie badanej (AUC 0,452; 95%CI 0,366-0,538; p=0,276).

## **Dyskusja**

To rozdział obejmujący łącznie 7 stron. Został on poprowadzony jasno i kompetentnie. Wszystkie najważniejsze i dyskusyjne wyniki zostały wnikliwie omówione przez Doktoranta w kolejnych akapitach tematycznych, z uwzględnieniem pozycji piśmiennictwa. Dane z przytaczanego piśmiennictwa zbieżne z tematem powyższej dysertacji zostały porównane z wynikami uzyskanymi przez Doktoranta. Podkreślenia wymaga fakt rzetelnej samooceny przewodu ujętej w podrozdziale „Ograniczenia badania”. Wszystkie uwzględnione przez Autora komentarze w pełni podzielam.

## **Wnioski**

Poniżej zacytowano sformułowane przez Doktoranta wnioski:

- 1. W przeciwieństwie do stężeń białka Klotho, stężenia FGF-23 różnią się istotnie w badanej grupie pacjentów z HF w porównaniu z grupą referencyjną bez niewydolności serca.*
- 2. Stężenie FGF-23 w surowicy koreluje ze stopniem dysfunkcji skurczowej lewej komory, natomiast nie zależy od etiologii niewydolności serca oraz zaawansowania zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych.*

3. Stężenie FGF-23 wzrasta proporcjonalnie do zaawansowania stanu klinicznego, korelując z nasileniem HF ocenionym w oparciu o skalę NYHA oraz stężeniem BNP, a zaobserwowane zależności wskazują na możliwość potencjalnego zastosowania oznaczeń stężenia FGF-23 w codziennej praktyce klinicznej.

4. Czynniki wzrostu fibroblastów 23 a nie białko Klotho, jest silnym niezależnym predyktorem zgonu z przyczyny sercowo-naczyniowych w grupie chorych z HF.

5. Stężenie FGF-23 w surowicy wykazuje dużą zdolność dyskryminacyjną, najwyższą w grupie chorych z VHD, co potencjalnie może mieć zastosowanie w identyfikacji pacjentów o szczególnie wysokim ryzyku wystąpienia poważnych incydentów sercowo-naczyniowych.

#### **Z obowiązku Recenzenta chciałabym przedstawić swoje uwagi oraz pytania do Doktoranta:**

1. Nie do końca jest jasne czy do grupy badanej byli włączani chorzy tylko z przewlekłą HF?
2. Jaki jest koszt oznaczenia białka Klotho/FGF-23 vs np. BNP/NT-proBNP?
3. Czy dynamika zmian markerów szczególnie FGF-23 może mieć znaczenie i jak to interpretować klinicznie?

#### **Podsumowanie**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa stanowi oryginalne i wartościowe dokonanie Doktoranta oraz świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu do pracy naukowej jak i wyborze jej tematyki. Praca badawcza wnosi nowe praktyczne przesłania kliniczne. Rozprawa przygotowana jest starannie, a temat, który podjął Doktorant w swojej dysertacji jest interesujący i na czasie.

Uwagi i pytania zawarte w recenzji mają pomniejsze znaczenie i nie zmieniają mojej ogólnej pozytywnej oceny klinicznej pracy badawczej, przedstawionej w rozprawie doktorskiej.

**Rozprawa lek. Bartosza Sosnowskiego pt. „Ocena białka Klotho i FGF23 w surowicy pacjentów z niewydolnością serca z uwzględnieniem jej etiologii oraz stopnia zaawansowania” spełnia warunki zgodne z art. 5.1 Rozporządzenia MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków**

przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U.2018 poz. 261).

Niniejsza dysertacja dowodzi bardzo dobrego przygotowania teoretycznego w dziedzinie odpowiadającej podjętemu tematowi, świadczy o umiejętności samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych oraz obiektywnej i krytycznej ocenie uzyskanych wyników.

Dlatego też mam zaszczyt przedstawić Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lek. Bartosz Sosonowski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Mateusz Tajstra  
Specjalista chorób wewnętrznych  
KARDIOLOG  
1863396