

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Jolanty Samulak
pt.: „Stężenie N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) w osoczu krwi ludzkiej w warunkach
fizjologicznych i patologicznych”**

1. Formalna podstawa opracowania recenzji

Formalną podstawę opracowania recenzji stanowi Uchwała nr 1 Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku z dnia 16 grudnia 2021r. w sprawie powołania recenzentów w przewodzie doktorskim mgr Joanny Samulak.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

2.1 Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Choroby cywilizacyjne o etiologii miażdżycowej, do których należą m.in. choroba wieńcowa, udar mózgu, choroby tętnic obwodowych, stenoza zastawki aortalnej, stanowią jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Równocześnie z rozwijaniem zaawansowanych metod medycyny naprawczej, której sukcesy przekładają się na poprawę rokowania pacjentów obciążonych chorobami serca i naczyń, poszukuje się nefarmakologicznych metod prewencji pierwotnej i prewencji wtórnej tych chorób, do których należą m.in.: stosowanie optymalnej diety, zwiększenie aktywności fizycznej, rzucenie palenia, interwencje psychospołeczne, nauka metod radzenia sobie ze stresem. W praktyce, w prewencji wtórnej chorób układu sercowo-naczyniowego (ang. CVD, cardiovascular disease) stosuje się programy kompleksowej rehabilitacji kardiologicznej, realizowane w warunkach stacjonarnych, w ośrodku dziennym lub jako kardiologiczna telerehabilitacja hybrydowa (HCTR, *hybrid cardiac telerehabilitation*) obejmująca fazę I prowadzoną w warunkach stacjonarnych lub w warunkach ambulatoryjnych w ośrodku/na oddziale dziennym, a następnie

fazę II realizowaną w warunkach domowych, w miejscu zamieszkania przy wykorzystaniu technologii transmisji danych.

W ostatnich latach uwagę naukowców zwróciły wyniki badań, w których wykazano pozytywny związek metabolitów mikrobiomu z rozwojem chorób cywilizacyjnych, takich jak nadciśnienie tętnicze, miażdżycy tętnic, niewydolność serca, choroby neurodegeneracyjne, a także insulinooporność i cukrzyca. Jak pokazały liczne eksperymenty na zwierzętach, jednym z metabolitów produkowanych przez mikrobiom jest trimetyloamina (TMA), która w wątrobie, na skutek reakcji katalizowanej przez flawinomonooksygenazę 3, ulega przemianie do N-tlenku trimetyloaminy (TMAO).

W 2011 roku Wang i wsp. zasugerowali w swojej pracy, że TMAO może uczestniczyć w rozwoju miażdżycy, tj. poprzez zmniejszenie odwrotnego transportu cholesterolu TMAO zwiększa wychwyt cholesterolu w ścianie naczynia, co prowadzi do tworzenia komórek piankowatych pochodzących głównie z makrofagów obciążonych cholesterolem i rozwoju zmian miażdżycowych. Najpewniej TMAO wpływa na zmniejszenie odwrotnego transportu cholesterolu podnosząc wychwyt cholesterolu w ścianie naczynia, prowadząc do tworzenia komórek piankowatych i rozwoju zmian miażdżycowych. W ostatnich meta-analizach wykazano, że u osób z wysokim stężeniem TMAO w osoczu częstość występowania poważnych niepożądanych incydentów sercowo-naczyniowych (ang. *MACE*, *major adverse cardiovascular events*) jest znacznie wyższa niż u pacjentów z niskim stężeniem TMAO.

W kontekście powyższych informacji podjęcie przez mgr Joannę Jolantę Samulak tematu: **„Stężenie N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) w osoczu krwi ludzkiej w warunkach fizjologicznych i patologicznych”** wydaje się być niezmiernie istotne z klinicznego punktu widzenia i stanowi ważny wkład do badań nad metodami profilaktyki chorób na podłożu miażdżycowym.

Doktorantka przyjęła w swojej pracy trzy główne cele badawcze:

- 1) określenie, czy stężenie TMAO w osoczu krwi jest modyfikowane podczas długotrwałej suplementacji karnityną i po jej zaprzestaniu oraz czy wywiera to wpływ na wybrane wskaźniki stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego u zdrowych ludzi,
- 2) ustalenie, czy 24-tygodniowy trening oporowy zmienia stężenie TMAO w osoczu oraz w jakim stopniu włączenie suplementacji karnityną do procesu treningowego wpłynie na zmianę stężenia TMAO,
- 3) określenie, czy stężenie TMAO w osoczu u osób z chorobą sercowo-naczyniową różni się od tego związku u osób zdrowych.

Do badania włączono kobiety w wieku 43-91 lat, bez rozpoznanej trimetyloaminurii.

We Wstępie rozprawy Doktorantka przedstawiła definicję zdrowia, omówiła rolę aktywności fizycznej i prawidłowo skonstruowanej, zbilansowanej diety na zmniejszenie ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych.

Podkreśliła rolę metabolitów mikrobiomu jelitowego, w tym- trimetyloaminy, na modulację stanu zdrowia żywiciela, w tym- wspomnianą wyżej produkcję TMA, która w wątrobie ulega przemianie do TMAO. W dalszej części omówiona została rola TMAO, w tym- znaczenie w osmoregulacji u ryb morskich poprzez wpływ na przepuszczalność błony komórkowej. TMAO również hamuje tworzenie agregatów białkowych, mogąc odgrywać istotną rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

Ważną częścią „Wstępu” jest omówienie korzystnego wpływu systematycznego treningu fizycznego wytrzymałościowego, jak również, co wiadomo z pracy przeglądowej z 2011r. (Strasser i Schobersberger), treningu oporowego, na zapobieganie stresowi oksydacyjnemu, redukcji stanu zapalnego i w konsekwencji miażdżycy. Ponadto w tej części rozprawy znaleźć można wartościowe informacje naukowe na temat m.in. wpływu tzw. diety śródziemnomorskiej na zmniejszenie ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Wstęp jest napisany w sposób logiczny, wyczerpujący, bez błędów merytorycznych.

W rozdziale „Materiał i metody” przedstawiła opis trzech badań, w ramach których dokonywano oznaczeń we krwi ludzkiej kobiet w przedziale wiekowym 43-91 lat. Materiał został pobrany w latach 2016-2019. Protokoły badań zostały zatwierdzone przez Niezależną Komisję ds. Badań przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

W pierwszym badaniu osoby badane przez 24 tygodnie (n=11 kobiet) otrzymywały doustnie L-karnitynę. Do grupy kontrolnej włączono 9 kobiet.

W badaniu 1 B oceniano wpływ zaprzestania suplementacji na badane wskaźniki w osoczu- po 12 miesiącach od zakończenia podaży L-karnityny.

W drugim badaniu uczestniczki podzielono na trzy grupy: I- grupa trenująca kontrolna uczestnicząca w protokole bez żadnej suplementacji; grupa II- otrzymująca suplementację L-leucyny, grupa III- otrzymująca suplementację L-leucyny i L-karnityny. Treningi odbywały się w grupach do 12 osób, dwa razy w tygodniu, na siłowni komercyjnej.

W trzecim badaniu kryterium włączenia pacjentów z ChSN była kwalifikacja do angiografii wieńcowej, z której to populacji wyselekcjonowano 3 grupy kobiet: I- z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) – n= 23; II- ze stabilną chorobą wieńcową, kwalifikowanych do elektrycznej koronarografii – n= 25; III- z niskim ryzykiem choroby wieńcowej, n=35.

Wyniki z badań Doktorantka przedstawiła w rozdziale nr 4, wskazując, że pod wpływem suplementacji karnityną stężenie TMAO w osoczu krwi ludzkiej zwiększyło się, co jednak nie

więzało się ze zmianami w profilu lipidowym oraz w wybranych wskaźnikach stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Wyniki stężeń TMAO w osoczu grup placebo oraz otrzymujących L-karnitynę przedstawiła na wykresach, natomiast wyniki w zakresie oceny stężeń biomarkerów stanu zapalnego, metabolitów lipidów w surowicy, markerów stanu zapalnego, liczbę krążących białych krwinek, częstotliwość spożycia ryb, spożycie energii i składników odżywczych w diecie w grupach badanych i kontrolnych – w postaci tabel.

Istotnych zmian w stężeniu TMAO nie stwierdzono natomiast po 24. tygodniach treningu oporowego; nie zaobserwowano także zmian pomiędzy stężeniem TMAO w osoczu krwi kobiet z chorobą sercowo-naczyniową a grupą kobiet zdrowych. Zaobserwowano jednak różnice w stężeniu trimetyloaminy (TMA) pomiędzy osobami z CVD a zdrowymi, co wskazuje m.in. na konieczność dalszych badań celem ustalenia potencjalnych korzyści lub szkodliwego działania metabolitów mikrobiomu jelitowego.

Rozdział „Dyskusja” wskazuje na umiejętność Doktorantki przeprowadzenia krytycznej analizy naukowej uzyskanych wyników i przedyskutowania ich z wynikami innych autorów. Ujawniła zdolność Autorki do przeanalizowania wyników badań nad TMAO na przestrzeni lat, zaczynając od postrzegania TMAO w ubiegłym stuleciu jako stabilizatora białek w warunkach stresu środowiskowego, przede wszystkim w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. W kolejnych badaniach kilkakrotnie wykazano, że zastosowanie suplementacji L-karnityną podwyższa poziom TMAO w osoczu. W badaniu przeprowadzonym przez Doktorantkę 10-krotny wzrost TMAO w osoczu, wywołany suplementacją L-karnityną, nie wpłynął na stężenia markerów zapalnych, tj. ICAM, VCAM, L-selektynę, P-selektynę, białko C-reaktywne, czynnik martwicy nowotworu i interleukinę-6.

2.2 Oryginalność podejmowanej tematyki badawczej, ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki.

Pomimo przeprowadzonych na świecie licznych badań klinicznych na temat wpływu treningu fizycznego i diety śródziemnomorskiej na ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym, badania oceniające efekty interwencji związanych ze stylem życia a poziomem TMAO są w literaturze przedmiotu bardzo skąpe. Na podstawie tych badań wiadomo, że w niektórych populacjach osób starszych, otyłych, z insulinoopornością, indukowane dietą ograniczenie spożycia kalorii połączone z treningiem fizycznym na bieżni ruchomej lub cykloergometrze, może w większym stopniu wpływać na zmiany poziomu TMAO w porównaniu z dietą eukaloryczną i aktywnością fizyczną. Ponieważ

TMAO jest sugerowany jako istotny czynnik rozwoju i progresji stanów patologicznych na podłożu miażdżycy, a L-karnityna jest wciąż stosowana jako suplement diety, Doktorantka podjęła się wyjaśnienia zagadnienia, czy długotrwałe stosowanie L-karnityny oraz czy zwiększona aktywność fizyczna wpływają na stężenie TMAO w osoczu ludzi zdrowych oraz w osoczu osób z przewlekłym zespołem wieńcowym lub po ostrym zespole wieńcowym. Oryginalność podjętej tematyki badawczej przejawia się również w ocenie, czy w/w działania wywierają istotny wpływ na wybrane wskaźniki stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego we krwi badanych osób. Cenne dla nauki było utworzenie grupy badanej jedynie z kobiet, które są populacją przez lata ubogo reprezentowaną w badaniach nad chorobą wieńcową. Recenzent docenia również zastosowanie treningu oporowego do oceny wpływu wysiłku na modyfikację stężenia TMAO w osoczu, gdyż większość naukowców skupia swoją uwagę na treningu wytrzymałościowym, traktując go jako najkorzystniejszy rodzaj wysiłku sugerowanego w prewencji miażdżycy. Główne korzyści z treningu oporowego obejmują zmianę składu ciała, mobilizację trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej, obniżenie spoczynkowego ciśnienia krwi, poprawę profilu lipidowego oraz lepszą kontrolę glikemii.

W wyniku badań Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski:

- 1) Suplementacja karnityną w sposób istotny, ale nie trwały, podwyższa stężenie TMAO w osoczu, przy czym zmiany te nie wywierają wpływu na profil lipidowy oraz wybrane wskaźniki stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego badanych
- 2) 24-tygodniowy trening oporowy nie jest czynnikiem wpływającym na modyfikację stężenia TMAO w osoczu
- 3) Obecność choroby sercowo-naczyniowej nie powoduje zmian stężenia TMAO w osoczu krwi, niemniej jednak zaobserwowano różnice w stężeniu TMA pomiędzy grupami.

Analizując wyniki i wyciągając wnioski z pracy Doktorantka podkreślała informacje z badań innych autorów, że karnityna i TMAO wywierają przeciwstawne działanie w kontekście rozwoju miażdżycy: karnityna cechuje się działaniem przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym, natomiast TMAO- działaniem prozapalnym i prooksydacyjnym. Doktorantka prawidłowo, w sposób krytyczny, przedyskutowała to zagadnienie w rozdziale „Wnioski”, wskazując na potrzebę prowadzenia dalszych badań i pogłębiania wiedzy w celu określenia potencjalnych korzyści lub szkodliwego działania mikrobiomu jelitowego.

Umiejętnie i merytorycznie opisała różnice w wynikach badań różnych autorów nad TMAO i L-karnityną, wykazując zrozumienie dla różnicy w opiniach naukowców. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie dla nauki i praktyki, gdyż – pomimo dynamicznego rozwoju medycyny naprawczej i badań nad czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, zdarzenia sercowo-naczyniowe nadal stanowią główną przyczynę zgonów w krajach wysoko rozwiniętych. Uzasadniają potrzebę prowadzenia dalszych badań w celu określenia roli TMAO w warunkach fizjologicznych i patologicznych.

2.3 Układ pracy, poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Przedstawiona rozprawa doktorska liczy 88 stron, w tym 15 tabel i 21 rycin. Wykaz skrótów zamieszczono na końcu rozprawy. Została napisana z zachowaniem typowego układu redakcyjnego. W rozprawie zachowano prawidłowe proporcje treści i zawartość rozdziałów. Praca jest napisana w sposób przemyślany, dobrze zorganizowany i zrozumiały.

Praca jest napisana poprawnie pod względem formalno-językowym, nie znaleziono również błędów ortograficznych. Celem udoskonalenia tekstu wartościowe mogłoby być unikanie skrótów myślowych i dookreślanie informacji o badanych wskaźnikach, np. „obserwowano korelację między stężeniem TMAO a CRP” zamiast „obserwowano korelację między TMAO a CRP”, „10-krotny wzrost stężenia TMAO w osoczu” zamiast „10-krotny wzrost TMAO w osoczu”, itp. Doktorantka nie ustrzegła się również niewielkich błędów literowych i stylistycznych, np. zdanie na str. 60 o ważnym ładunku merytorycznym jest niekompletne: „Jako że w wyniku suplementacji L-karnityną zwiększa się stężenie krążącego TMAO, należałoby zaobserwować negatywny wpływ suplementacji L-karnityną w dotychczasowych badaniach”, czy „na str. 61 „że dieta osób biorące udział w naszych badaniach”. Są to natomiast subtelne niedoskonałości, które w żaden sposób nie umniejszają wartości rozprawy.

3. Ocena metodologiczna

3.1 Poprawność doboru grupy badanej, formułowania problemów i założeń badawczych.

Doktorantka prawidłowo dobrała zarówno grupy badane jak i kontrolne, właściwie sformułowała cele pracy. Zastosowana liczba pacjentów w grupie pozwoliła na wyciągnięcie

wiążących wniosków z pracy, natomiast zwiększenie liczebności badanej populacji w badaniu 1. i 2. niewątpliwie jeszcze bardziej podniosłoby wartość naukową rozprawy.

3.2 Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania

Doktorantka trafnie dobrała i wykorzystała metody oraz narzędzia badawcze. Przed rozpoczęciem badań wszyscy chętni zostali zapoznani z procedurą badawczą i wyrazili pisemną, świadomą zgodę na uczestniczenie w badaniach. W sposób obrazowy przedstawiła schematy interwencji pobierania próbek krwi we wszystkich trzech badaniach. Metody badań opisała wystarczająco precyzyjnie, z uwzględnieniem szczegółowych opisów pobierania próbek krwi do badań, przechowywania materiału do analizy, przeprowadzania oznaczeń biochemicznych, co umożliwia powtórzenie badania przez inny zespół badawczy, gdyby zaistniała taka potrzeba. Prawdłowo dobrała narzędzia statystyczne.

Za bardzo przydatne Recenzent uważa zamieszczenie rycin z ilustracją pozycji wyjściowej i pozycji końcowej ćwiczeń realizowanych podczas 24-tygodniowego programu treningu oporowego zgodnie z protokołem szczegółowo opisanym w tekście. Doktorantka podjęła słuszną decyzję włączenia do analizy tylko tych kobiet, które uczestniczyły w minimum 80% zajęć. Rozprawa doktorska potwierdza umiejętności Doktorantki w zakresie samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

3.3 Dobór literatury, umiejętność wykorzystania źródeł

Spis piśmiennictwa umieszczony jest typowo - na końcu pracy, i ułożony w kolejności alfabetycznej. Literatura została dobrana i wykorzystana prawidłowo, z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa na temat m.in. TMAO, stresu oksydacyjnego i biomarkerów chorób na podłożu miażdżycy.

Doktorantka wykazała się umiejętnością wykorzystania w pracy badawczej anglojęzycznych źródeł naukowych. Na uwagę i wyróżnienie zasługuje fakt opublikowania przez Doktorantkę, będącą pierwszym autorem dwóch wykorzystanych w rozprawie publikacji, części wyników w czasopismach naukowych, tj. „*L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxide but not markers of atherosclerosis in healthy aged women*” w *Annals of Nutrition and Metabolism* w roku 2019 oraz *Nutrients*, również w roku 2019. Była również współautorem cytowanych w rozprawie doktorskiej artykułów opublikowanych w renomowanych

czasopismach naukowych na temat TMAO, suplementacji L-karnityny oraz czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, m.in. w artykule pt. *Mitochondrial DNA copy number and trimethylamine levels in the blood: New insights on cardiovascular disease biomarkers*, opublikowanym w *FASEB J. – Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, opublikowanym w zeszłym roku.

4. Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Joanny Jolanty Samulak pt.: „Stężenie N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) w osoczu krwi ludzkiej w warunkach fizjologicznych i patologicznych”** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Potwierdza umiejętność Doktorantki w zakresie samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Praca doktorska mieści się w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej.

W oparciu o powyższe, rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku o dopuszczenie mgr Joanny Jolanty Samulak do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania Doktorantce stopnia **doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej**. Równocześnie, biorąc pod uwagę wagę kliniczną podjętej tematyki badawczej, ponadstandardową ilość pracy włożonej przez Doktorantkę do przeprowadzenia badań, wyróżniającą się spośród innych rozpraw doktorskich umiejętność przeprowadzenia dyskusji naukowej i niezmiernie staranne przygotowanie rozprawy, wnoszę o jej wyróżnienie.

Dominika Szalewska