

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

Badania naukowe donoszą, że dieta bogata w karnitynę, fosfatydylocholinę i cholinę sprzyja miażdżycy. Dzieje się tak dlatego, że związki te są metabolizowane przez mikroorganizmy jelitowe do trimetyloaminy, która w wątrobie jest przekształcana do toksycznego N-tlenku trimetyloaminy. Związek ten uznawany jest za potencjalny przyczynik chorób sercowo-naczyniowych. Okazuje się również, że może być szkodliwy dla sportowców uprawiających biegi długodystansowe lub kolarstwo. W następstwie niedotlenienia jelit, w wyniku przedłużającego się wysiłku fizycznego, dochodzi do dysymbiozy jelitowej i uwalniania prekursora N-tlenku trimetyloaminy. Dlatego też uważam, że tematyka badawcza podjęta przez mgr Joannę Samulak wydaje się szczególnie interesująca.

Formalna podstawa recenzji

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Jolanty Samulak została przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku z dnia 16.12.2021 r.

Ocena dysertacji

Manuskrypt, który otrzymałam do oceny to liczące 88 stron opracowanie o układzie treści typowym dla prac doświadczalnych. Dokumentację uzyskanych wyników stanowi 11 tabel i 7 rycin, na początku pracy Autorka zamieściła streszczenie w języku polskim, a na końcu streszczenie w języku angielskim. Piśmiennictwo obejmuje praktycznie w całości anglojęzyczne, oryginalne prace.

Część przeglądowa („Wstęp”)

We „Wstępie” Autorka wyodrębniła pięć głównych podrozdziałów. W pierwszym z nich wyjaśniła definicję zdrowia i krótko omówiła czynniki determinujące jego stan. Następnie scharakteryzowała mechanizm powstawania N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) i jego budowę chemiczną, fizjologiczne funkcje jakie pełni w żywych organizmach oraz jego występowanie. W kolejnym podrozdziale opisała determinanty wpływające na stężenie TMAO, do których zaliczyła mutacje genetyczne, wiek, płeć, dietę, stan nerek oraz reakcje wolnorodnikowe. Autorka podkreśliła rolę tego związku w różnych stanach patologicznych, w tym w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Następnie szczegółowo omówiła patogenezę miażdżycy i rolę różnych czynników zapobiegających jej rozwojowi. Wśród nich, oprócz regularnej aktywności fizycznej i diety, przybliżyła rolę L-karnityny, która dzięki właściwościom antyoksydacyjnym skutecznie usuwa reaktywne formy tlenu i azotu, i w ten sposób chroni przed skutkami stresu oksydacyjnego. W ostatnim podrozdziale, w oparciu o dostępne piśmiennictwo, mówiła zastosowanie L-karnityny w chorobach sercowo-naczyniowych.

Podsumowując „Wstęp” jest starannie przygotowaną częścią przeglądową dysertacji, świadcząca o szerokiej wiedzy i zrozumieniu trudnej tematyki. Jego układ jest logiczny i podporządkowany przedstawionemu celowi badań.

„Cele”

W kolejnym rozdziale dysertacji („Cele”) Autorka sformułowała trzy cele badań, które jednocześnie są pytaniami badawczymi. Badania miały wyjaśnić czy długotrwała suplementacja L-karnityną modyfikuje stężenie N-tlenku trimetyloaminy w osoczu krwi i czy ma to wpływ na wskaźniki stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego u zdrowych osób, czy 24-tygodniowy trening oporowy lub trening w połączeniu z suplementacją karnityną wpłyną na stężenie TMAO oraz czy stężenie tego związku w osoczu u osób ze zdiagnozowaną chorobą sercowo-naczyniową różni się od jego stężenia u osób zdrowych?

Zasadniczo nie mam większych uwag do tej części pracy, chociaż wydaje mi się, że lepiej byłoby sformułować główny cel pracy i pytania badawcze. Moja uwaga dotyczy celu drugiego, z którego nie wynika bezpośrednio, w jakiej grupie badanych miał być realizowany 24-tygodniowy trening oporowy.

„Materiał i metody”

„Materiał i metody” to obszerna część pracy, w której Autorka prezentuje trzy odrębne protokoły badań zawierające (każdy z osobna) informacje o zgodzie komisji bioetycznej i narzędziach statystycznych użytych do analizy uzyskanych wyników badań.

Pierwsze badanie (1A) obejmowało grupę zdrowych, niepalących kobiet (n=20) w wieku 65-70 lat, które zostały losowo przydzielone do dwóch grup: suplementowanej L-karnityną w dawce 1500mg przez okres 24-tygodni i placebo. Zgodnie z informacją zamieszczoną przez Autorkę wyniki te zostały już wcześniej opublikowane. W opisie tego protokołu dostrzegłam jednak pewną niezgodność, która dotyczy ryciny 5 z informacją zawartą w tekście na stronie 24. Z liczby strzykawkę zamieszczonych na schemacie wynika, że krew była pobierana pięciokrotnie, podczas gdy w tekście Autorka pisze: *„W okresie suplementacji krew pobierana była trzykrotnie, na początku badań, po 12- i 24-tygodniach suplementacji.”* Ponadto, pomimo dużej liczby analizowanych wskaźników, dość ubogi jest ich opis. W zestawach komercyjnych przeznaczonych do ich oznaczania zamieszczone są ważne informacje, które zwyczajowo podaje się także w publikacjach naukowych, czyli czułość metody, błąd wewnątrzoznaczeniowy i międzyoznaczeniowy (CV%), zakres referencyjny, a przede wszystkim jednostki, w jakich są one wyrażane.

W badaniu 1B, którego wyniki zostały opublikowane w 2019 roku, oceniała wpływ suplementacji L-karnityną na pracę mięśni szkieletowych. Opis tego badania został stosunkowo pobieżnie przedstawiony. Nie wynika z niego, jaki rodzaj wysiłku fizycznego badane wykonywały, jak długo i czy podział badanych był losowy. Za wyjątkiem stężenia N-tlenku trimetyloaminy oznaczano również wskaźniki gospodarki lipidowej.

W kolejnym protokole uczestniczyły również dojrzałe kobiety, które losowo zostały przydzielone do trzech grup: kontrolnej, suplementowanej L-leucyną w dawce 4000 mg i suplementowanej L-leucyną z L-karnityną w dawce odpowiednio 1000 mg i 3000 mg. Wszystkie badane realizowały 24-tygodniowy program treningowy, który został szczegółowo opisany i zilustrowany rycinami. Wachlarz oznaczeń biochemicznych był podobny do wykonanych w poprzednio opisanych protokołach.

Do tej części mam również pewne uwagi. Przede wszystkim brakuje informacji, dlaczego właśnie taki program treningowy został wybrany. Z kolei druga uwaga dotyczy grupy suplementowanej L-leucyną. Dlaczego badane były suplementowane tym związkiem? Cele pracy nie wskazują na ten rodzaj suplementacji. Poza tym odwołania w tekście do rycin wprowadzają czytelnika w błąd (np. przywołanie ryc.6 zamiast 7).

Ostatni protokół obejmował pacjentki z chorobami sercowo – naczyniowymi, z których wyodrębniono trzy grupy: a) grupę kobiet z ostrym zespołem wieńcowym, b) grupę kobiet ze stabilną chorobą wieńcową i c) grupę kobiet z niskim ryzykiem choroby wieńcowej. W ramach oznaczeń biochemicznych wykonano standardowo oznaczenia trimetyloaminy i N-tlenku trimetyloaminy oraz wskaźniki gospodarki lipidowej.

Podsumowując metodologię badań muszę przyznać, że nie był on dla mnie całkowicie przejrzysty. Wydaje mi się, że powielanie pewnych treści np. oznaczeń biochemicznych nie było potrzebne. Taką informację można było umieścić tylko raz, wskazując przy tym jakie wskaźniki były oznaczane w danym protokole. Autorka nie wyjaśniła także wszystkich użytych w części metodologicznej skrótów (np. MPO, VCAM-1 itp.). Pragnę również zwrócić uwagę, że w przypadku gdy podaje się wzory wykorzystane do wyliczenia wartości wskaźników, powinno odnieść się do przypisów. Dotyczy to wzoru Friedewalda (str. 33), który posłużył Autorce do wyliczenia stężenia cholesterolu frakcji LDL oraz wzoru wykorzystanego do obliczenia wskaźnika aterogenności osocza (AIP, str. 36). Ze wzoru wykorzystanego do wyliczenia AIP nie wynika również, w jakich jednostkach były wyrażone wartości wskaźników użytych do jego obliczenia.

„Wyniki”

kolejnym rozdział „Wyniki” Autorka prezentuje dane z poszczególnych badań omówionych w części metodologicznej w formie przejrzystych tabel i rycin oraz ich opisu. Autorka wynikami swoich badań potwierdziła między innymi, że:

- 1) suplementacja L-karnityną wpłynęła na 10-krotne podwyższenie stężenia N-tlenku trimetyloaminy w stosunku do wartości wyjściowych,
- 2) 24-tygodniowy trening oporowy nie wpłynął na stężenie TMAO u badanych kobiet,

- 3) wraz ze wzrostem ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych poziom trimetyloaminy wzrastał.

Prezentacja wyników jest zasadniczo czytelna. Przyjmuje się jednak, że wyniki powinny korespondować z metodologią badań. Niestety dostrzegłam w tym zakresie pewne nieścisłości. I tak dla przykładu Autorka w części „Wyniki” omawia wskaźnik wykorzystany do oceny insulinooporności (HOMA-IR), podczas gdy w metodologii badań nie ma żadnej wzmianki, w jaki sposób był liczony.

„Dyskusja”

„Dyskusję” Autorka rozpoczęła od podsumowania wyników swoich badań. Następnie omówiła je w kontekście suplementacji L-karnityną, która została przez z nią wskazana *„jako główny składnik odpowiedzialny za rozwój miażdżycy”*. Jest to szczególnie interesujące zwłaszcza dlatego, że o ile karnityna posiada właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające, to z drugiej strony jest konwertowana to N-tlenku trimetyloaminy, który ma działanie prooksydacyjne i prozapalne. Następnie odniosła się do roli stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w rozwoju miażdżycy. Szczególnie interesujący fragment tej części pracy dotyczy roli regularnej aktywności fizycznej i diety w redukcji stężenia TMAO oraz w prewencji chorób sercowo-naczyniowych.

Podsumowując dyskusję muszę przyznać, że Autorka w sposób interesujący zinterpretowała wyniki swoich badań, odnosząc je do osiągnięć innych autorów. Ponadto wykazała się znajomością wielu prac z zakresu prowadzonych badań.

„Dyskusję” kończą trzy wnioski będące odpowiedzią na pytania zawarte w celach pracy oraz zwięzłe podsumowanie wskazujące na potrzebę dalszych badań.

Uwagi końcowe

Reasumując stwierdzam, że Pani mgr Joanna Jolanta Samulak podjęła się opracowania ważnego tematu, dotyczącego oceny stężenia N-tlenku trimetyloaminy w osoczu krwi kobiet suplementowanych L-karnityną bez lub z włączeniem

24-tygodniowego treningu oporowego oraz u kobiet obciążonych chorobami sercowo-naczyniowymi. Zgodnie z podaną informacją wyniki częściowo zostały już opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu. Uważam, że Autorka wykazała się umiejętnością wykorzystywania nowoczesnych technik doświadczalnych i metod analizy statystycznej oraz dobrą znajomością podstaw badanych zagadnień.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie zwrócić uwagę na drobne uchybienia o charakterze edytorskim, które pojawiły się w kilku miejscach w pracy. Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości dysertacji, którą oceniam pozytywnie.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku o dopuszczenie Pani mgr Joanny Jolanty Samulak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewa Sadowska-Kuczo