

Dr hab. n. med. Piotr Dobrowolski, prof. inst.
Kierownik Samodzielnej Poradni Lipidowej
Klinika Nadciśnienia Tętniczego
Narodowy Instytut Kardiologii

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/13604/2022_P
Data:2022-09-01

| | |
|--|------------|
| Uniwersytet Medyczny BIURO REKURSYJNY NAI MEDYCZNE | |
| wpl. dnia | 01-09-2022 |
| L. dz. RN-BM/ | 1385 |

Wpły 02.09.22
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
zastępca przewodniczącego
M. Podhorska-Okołów
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Ocena rozprawy doktorskiej lekarza Macieja Bładowskiego „Biotransformacja tlenu azotu i ocena funkcji płytek krwi u pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego udaru niedokrwiennego mózgu”.

Zachorowalność na udar niedokrwienny mózgu wśród mieszkańców Europy wynosi obecnie w przybliżeniu 1 milion/rok, z prognozowanym dalszym wzrostem w ciągu najbliższych 3 dekad, mimo stosowania coraz skuteczniejszych metod profilaktyki chorób układu sercowo-naczyniowego. Udar niedokrwienny mózgu można podzielić na kilka podtypów, w oparciu o patogenezę materiału zakrzepowego powodującego upośledzenie przepływu krwi w łożysku krążenia mózgowego. Najczęściej występującym typem jest niekardiogeny udar mózgu odpowiadający za 70-80% przypadków udarów. Najczęściej stosowaną metodą prewencji wtórnej jego wystąpienia o udokumentowanej skuteczności jest leczenie przeciwplatek. A co z prewencją pierwotną występowania udaru? Niestety zastosowanie leków przeciwplatekowych u niewyselekcjonowanej grupy pacjentów w ramach prewencji pierwotnej niekardiogenego udaru nie przynosi oczekiwanej korzyści pod postacią zmniejszenia ryzyka wystąpienia incydentu niedokrwienia mózgu. W związku z tym mechanizmy patofizjologiczne wpływające na funkcję płytek krwi u pacjentów z niekardiogenym udarem niedokrwiennym mózgu wymagają szczególnie dokładnego poznania, celem znalezienia nowych strategii profilaktycznych i terapeutycznych w tej grupie chorych. Dysfunkcja śródbłonna wyrażona obniżoną biodostępnością tlenu azotu (NO), oprócz aktywacji zapalnej, angiogennej i wazokonstrykcji, odgrywa istotną rolę w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego. W licznych badaniach udowodniono wpływ obniżonej biodostępności NO na rozwój nadciśnienia tętniczego, tworzenie blaszki miażdżycowej i jej destabilizację oraz na wzrost aktywacji, adhezji i zdolności do agregacji płytek krwi. Z kolei obniżanie ryzyka sercowo-naczyniowego, poprzez odpowiednią terapię nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, dyslipidemii, czy zaprzestanie palenia papierosów, wiąże się z obserwowanym wzrostem biodostępności tlenu azotu i z poprawą funkcji śródbłonna. Nowsze dane sugerują, że nie tylko śródbłonek, ale również płytki krwi potrafią syntetyzować NO, samodzielnie regulując w ten sposób swoją funkcję. W zależności od ekspresji syntetazy tlenu azotu (NOS) wykazano istnienie dwóch odrębnych subpopulacji płytek: NOS-pozytywnych i NOS-negatywnych. Według niektórych autorów płytki NOS-negatywne są odpowiedzialne za adhezję do dysfunkcjonalnego śródbłonna oraz inicjowanie tworzenia zakrzepu, podczas gdy rolę NOS-pozytywnych jest ograniczanie agregacji. Wpływ zaburzeń biotransformacji tlenu azotu w płytkach krwi może zatem mieć wpływ na wzrost częstości występowania incydentów

zakrzepowo-zatorowych, w tym także w łożysku naczyń mózgowych. Zaburzenia wewnątrzpłytkowej biotransformacji tlenu azotu u osób z niekardiogenym udarem niedokrwiennym mózgu mogą być odpowiedzialne za inicjację incydentu niedokrwiennego w ośrodkowym układzie nerwowym.

Dlatego też, lekarz Maciej Bładowski jako główny cel badań będących przedmiotem pracy doktorskiej założył, że zaburzenia wewnątrzpłytkowej biotransformacji tlenu azotu u osób z niekardiogenym udarem niedokrwiennym mózgu mogą być odpowiedzialne za inicjację incydentu niedokrwiennego w ośrodkowym układzie nerwowym. Doktorant podjął się analizy tematu istotnego nie tylko naukowo, ale również bardzo przydatnego w codziennej praktyce klinicznej. Wyodrębnienie pacjentów z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym lub z nadmiarem płytkowych inhibitorów NOS i w efekcie zmniejszoną płytkową syntezą NO mogłoby przynieść korzyści w leczeniu przeciwpłytkowym stosowanym w ramach profilaktyki pierwotnej u tych chorych. Z kolei ograniczenie stosowania terapii przeciwpłytkowej u pacjentów z dużym odsetkiem NOSpozytywnych płytek mogłoby wpłynąć na wzrost bezpieczeństwa prowadzonej terapii poprzez redukcję ryzyka krwawień.

Rozprawa doktorska lekarza Macieja Bładowskiego ma formę spójnego tematycznie cyklu dwóch artykułów (jeden oryginalny i jeden pogładowy). Prace zostały opublikowane w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach naukowych (Oxidative Medicine and Cellular Longevity oraz Antioxydants). Obydwa czasopisma posiadają wysoki współczynnik oddziaływania (odpowiednio IF = 6,543 i IF = 6,313). Należy podkreślić, że w obydwu publikacjach doktorant jest pierwszym autorem. Łączna punktacja publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej (współczynnik oddziaływania Impact Factor 12,856 oraz 200 punktów MEiN). Należy zaznaczyć, że pomimo tylko dwóch prac wchodzących w cykl, ich punktacja jest bardzo wysoka, co wskazuje na wysoką wartość poznawczą prezentowanych wyników.

Rozprawa doktorska lekarza Macieja Bładowskiego liczy 66 stron i ma układ klasyczny dla prac doktorskich w formie cyklu publikacji. Składa się ze: spisu treści, wykazu publikacji składających się na dysertację, omówienia publikacji wchodzących w skład rozprawy, kopii publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, oświadczeń współautorów, streszczeń w języku polskim i angielskim, piśmiennictwa. Ponadto, załączono zgodę Komisji Bioetycznej (Nr KB – 145/2020) przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu z dnia 30 marca 2020 roku na przeprowadzenie badania.

Rozprawa napisana jest jasno, pod względem redakcyjnym nie budzi istotnych zastrzeżeń.

Uzyskane wyniki oraz dyskusja zostały zawarte w przykładowie napisanych publikacjach, które składają się na rozprawę doktorską lekarza Macieja Bładowskiego. Cykl artykułów oparty został na wiedzy Doktoranta z zakresu biotransformacji tlenu azotu, funkcji płytek krwi u pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego udaru niedokrwiennego mózgu. Zaowocowało to dwoma artykułami, jednym pogładowym i jednym oryginalnym.

Pierwsza z prac: „Role of the Platelets and Nitric Oxide Biotransformation in Ischemic Stroke: A Translative Review from Bench to Bedside” opublikowana w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2020, doi: 10.1155/2020/2979260 stanowi bieżące podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat mechanizmów wpływających na biotransformację tlenku azotu w płytkach krwi i osoczu.

Należy podkreślić, że powyższy artykuł jest jednym z niewielu dostępnych w literaturze przekrojowych zbiorów informacji dotyczących dokładnej roli tlenku azotu w utrzymaniu homeostazy wewnątrznaczyniowej u pacjentów z objawowym niedokrwieniem w łożysku naczyń mózgowych.

Praca przedstawia i systematyzuje w szerokim zakresie zapoczątkowane przez zespół, w którym pracuje lekarz Maciej Bładowski, badania w zakresie biotransformacji tlenku azotu w płytkach krwi i osoczu oraz jej wpływu na wystąpienie i przebieg udaru niedokrwienego mózgu. Warto zaznaczyć, że artykuł poglądowy, którego pierwszym autorem jest doktorant, w sposób klarowny porządkuje najnowszą wiedzę, a wykonane ryciny ułatwiają przyswojenie tej bardzo dużej ilości wiedzy.

Dane zawarte w artykule potwierdzają, że tlenek azotu hamuje adhezję i agregację płytek krwi, a obecność syntetazy tlenku azotu (NOS) w płytkach krwi determinuje ich pro- lub przeciw-agregacyjną funkcję. Z kolei w nielicznych dostępnych pracach, zawarty w pracy poglądowej Doktoranta wykazano związek pomiędzy obniżonym płytkowym stężeniem tlenku azotu (PDNO, ang. platelet-derived nitric oxide) a wiekiem, nadciśnieniem tętniczym, dyslipidemią i paleniem papierosów. Jednak do tej pory nie oceniano związku pomiędzy obniżonym PDNO, a rozwojem i przebiegiem udaru niedokrwienego mózgu. W badaniach na zwierzętach wykazano pozytywny wpływ leków przeciwplateletowych na wzrost stężenia osoczowego NO i jednocześnie spadek aktywności iNOS po okluzji tętnicy środkowej mózgu. W związku z tym, czy występują różnice pomiędzy ekspresją metabolitów biotransformacji NO w osoczu i w płytkach krwi ich funkcji u pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego udaru niedokrwienego mózgu, w porównaniu do grupy kontrolnej bez ostrego incydentu niedokrwienego w obszarze OUN?

Autor postanowił odpowiedzieć na powyższe pytanie planując stosowne badanie u chorych po przeżytym udarze niedokrwienym, w porówniu do grupy kontrolnej. Wyniki opublikował w artykule wchodzącym w cykl pracy doktorskiej pt: „Changes in the plasma and platelet nitric oxide biotransformation metabolites during ischemic stroke- a dynamic human LC/MS metabolomic study” w *Antioxidants*, Volume 2022, doi: 10.3390/antiox11050955.

Celem badania była ocena czy istnieją różnice pomiędzy ekspresją metabolitów biotransformacji NO w osoczu i w płytkach krwi oraz ich funkcji u pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego udaru niedokrwienego mózgu, w porównaniu do grupy kontrolnej bez ostrego incydentu niedokrwienego w obszarze OUN.

Spośród 418 pacjentów z podejrzeniem udaru niedokrwiennego mózgu, kryteria włączenia spełniło 40 chorych. Grupę kontrolną stanowiło 39 osób dopasowanych demograficznie, pod względem farmakoterapii oraz ze szczególnym uwzględnieniem występowania chorób sercowo-naczyniowych. U chorych z potwierdzonym udarem niedokrwiennym mózgu rozpoczęto podawanie kwasu acetylosalicylowego (ASA) w pierwszej dobie hospitalizacji, zgodnie z wytycznymi oraz przeprowadzono badanie neurologiczne. W kolejnym etapie badania zabezpieczano krew celem oceny biotransformacji tlenu azotu w płytkach krwi i osoczu oraz wykonywano pomiar parametrów agregacji płytek krwi trzykrotnie: w ciągu pierwszych 24 godzin od początku objawów neurologicznych, w 3. dobie i 7. dobie udaru niedokrwiennego mózgu. W grupie kontrolnej badania przeprowadzono jednokrotnie, bez podawania ASA.

Głównym wynikiem badania było stwierdzenie w grupie badanej w 1. i 3. dniu wyższego stężenia L-Argininy w płytkach krwi i niższe stężenie L-Argininy w osoczu, w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie inhibitorów syntetazy tlenu azotu (asymetrycznej dimetyloargininy - ADMA i symetrycznej dimetyloargininy - SDMA) w płytkach krwi były stabilnie podwyższone w grupie badanej od 1. do 7. dnia obserwacji. Agregacja płytek krwi zależna od kwasu arachidonowego była ujemnie skorelowana z płytkową biodostępnością tlenu azotu (*L-Arginina (płytki)* *ADMA (płytki)*) w 3. i 7. dniu, a dodatkowo z płytkową biodostępnością kompetycyjnego inhibitora NOS (*ADMA (płytki)* *ADMA (osocze)*) w 7. dniu obserwacji. Agregacja płytek krwi zależna od kolagenu była ujemnie skorelowana z płytkową biodostępnością tlenu azotu i dodatkowo z płytkową biodostępnością kompetycyjnego inhibitora NOS w 7. dniu obserwacji. ADP-zależna agregacja była dodatkowo skorelowana z płytkową biodostępnością kompetycyjnego inhibitora NOS jedynie w 1. dniu obserwacji.

Podsumowując wyniki, wykazano, że osoby z niekardiogenym udarem niedokrwiennym mózgu charakteryzują się wyższym stężeniem wewnątrzpłytkowych inhibitorów syntetazy tlenu azotu w porównaniu z osobami zdrowymi, co może być przyczyną występowania u nich upośledzonego wytwarzania płytkopochodnego tlenu azotu i tym samym sprzyjać zwiększonej agregacji trombocytów w trakcie ostrej fazy niedokrwienia.

Wyniki prezentowane przez Doktoranta stanowią mogą podstawę do kolejnych badań nad wpływem obniżonej płytkowej biodostępności tlenu azotu na wzrost ryzyka sercowo-naczyniowego oraz nad możliwością wyselekcjonowania grupy pacjentów mogących odnieść zysk z leczenia przeciwplatekowego w prewencji pierwotnej udaru niedokrwiennego mózgu, a zatem personalizacji terapii. Praca ta stanowi tym samym przykład wykorzystania medycyny translacyjnej, przenosząc wyniki badań z zakresu nauk podstawowych na grunt kliniczny. Należy podkreślić, że dotychczas tego typu badania wykonywane były na modelu zwierzęcym, a wyniki zaprezentowane przez Doktoranta są

pierwszym tego typu badaniem w populacji ludzkiej. Jest to niewątpliwie duży walor poznawczy badania.

Warto podkreślić, że w oryginalnym artykule bardzo dokładnie zdefiniowano metodykę badania, oraz w niezwykle przystępny sposób przedstawiono jego wyniki. Natomiast dyskusja wyników wskazuje na bardzo dobrą znajomość przez Doktoranta podjętego zagadnienia, a zacytowana literatura jest bardzo aktualna. Ponadto należy dodać, że zarówno w pracy poglądowej jak również oryginalnej Doktorant powołuje się na prace powstałe w zespole pod kierownictwem Profesora Adriana Doroszki, niewątpliwego eksperta w dziedzinie medycyny translacyjnej. Ponadto, chciałbym zwrócić uwagę na obecność akapitu podsumowującego ograniczenia pracy w drugiej publikacji (praca oryginalna). Świadczy to o krytycyzmie znamionującym dojrzałego naukowca.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską lekarza Macieja Bładowskiego należy z obowiązku recenzenta muszę nadmienić, że korekty w dysertacji wymaga rozwinięcie skrótów w części „Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy”. Ułatwi to bez wątpienia jej lekturę.

Lektura publikacji wchodzących w skład cyklu nasunęła mi również pytanie. Czy zdaniem Doktoranta ocena stężenia wewnątrzplętkowych inhibitorów syntetazy tlenu azotu powinno być zalecana u większej liczby chorych, szczególnie u tych bardzo wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego? Otrzymane wyniki zachęcają do włączenia tego typu badania w celu wczesnego wdrożenia już prewencji pierwotnej. Tego typu postępowanie może przyczynić się do zmniejszenia częstości występowania udarów mózgu i wszystkich konsekwencji z nim związanych dla pacjenta, ale również systemu opieki zdrowotnej.

Rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 poz.85 z późn.zm). Dlatego też, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej lekarza Macieja Bładowskiego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza Macieja Bładowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o jej wyróżnienie.

Dr hab. n. med. Piotr Dobrowolski
Profesor Instytutu
specjalista kardiolog
PWZ 2312184