

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. Macieja Bładowskiego
Biotransformacja tlenu azotu i ocena funkcji płytek krwi u pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego udaru niedokrwiennego mózgu.
dr hab. Jacek Wolf, Klinika Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny. Gdańsk, dnia 08 października 2022 r.

RECENZJA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH LEK. MACIEJA BŁADOWSKIEGO

PT. BIOTRANSFORMACJA TLENKU AZOTU I OCENA FUNKCJI PŁYTEK KRWI U PACJENTÓW

W OSTREJ FAZIE NIEKARDIOGENNEGO UDARU NIEDOKRWIENNEGO MÓZGU.

Dr hab. n. med. Jacek Wolf
Klinika Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii
Gdański Uniwersytet Medyczny



Gdańsk, dnia 08 października 2022 r.

Dane epidemiologiczne dotyczące udarów mózgu w populacjach europejskich wykazują niekorzystną tendencję wzrostową. W Polsce co kilka minut diagnozujemy nowy przypadek udaru, co w skali roku sumuje się do 60 tysięcy zachorowań. Udar mózgu konsekwentnie klasyfikowany jest na trzecim, niechlubnym miejscu przyczyn przedwczesnych zgonów osób dorosłych, po chorobach serca i nowotworach. Udary stanowią także jedną z najczęstszych przyczyn trwałego inwalidztwa osób po 40. roku życia. Pomimo, że zapadalność na udar mózgu w Polsce kształtuje się na średnim poziomie europejskim, to wskaźniki umieralności w tej grupie chorych są jednymi z najwyższych w Europie. Jednocześnie w Polsce, w grupie pacjentów, którzy przeżyli udar mózgu odsetek chorych z trwałym inwalidztwem jest istotnie wyższy niż w lepiej zorganizowanych pod względem standardu opieki medycznej krajach Zachodniej Europy. Dlatego podjęcie tematu precyzyjnej fenotypizacji chorych z udarem właśnie w Polsce ma szczególne znaczenie.

Udary mózgu stanowią niehomogenne zespoły chorobowe, których istotę patofizjologiczną i kliniczną jedynie częściowo opisują dostępne klasyfikacje. Skupiając naszą uwagę na udarach niedokrwiennych, wśród których większość przypadków (do 80%) stanowią tzw. epizody niekardiogenne, warto odnotować, że rutynowo stosowaną metodą prewencji wtórnej ponownego wystąpienia urazu niedokrwiennego mózgu stanowi leczenie przeciwplatek. Jest to udokumentowane klinicznie i skuteczne działanie poprawiające rokowanie w zakresie przeżycia i ograniczenia deficytów neurologicznych. Z uwagi na powikłania krwotoczne, nie udało się jednakże wykazać wyższości takiej strategii leczenia prewencyjnego w niewyselekcjonowanej grupie osób zagrożonych wystąpieniem udaru pierwszy raz w życiu. Kluczem wydaje się tutaj właściwy opis fenotypu pacjentów, z uwzględnieniem czynników regulujących funkcję płytek krwi.

Zaburzenie funkcji śródbłonka odgrywa istotną rolę w patogenezie licznych schorzeń układu krążenia, w tym w ostrych i przewlekłych incydentach niedokrwiennych. Bezspornie udowodniono wpływ obniżonej

biodostępności tlenu azotu na rozwój nadciśnienia tętniczego, tworzenie blaszki miażdżycowej i jej destabilizację oraz na wzrost aktywacji, adhezji i zdolności do agregacji płytek krwi. Odwołując się do ostatnio publikowanych obserwacji, warto odnotować, że zmiany w zakresie biodostępności NO mogą dotyczyć nie tylko komórek endotelium, ale także płytek krwi. Fakt ten rzuca nowe światło na regulację funkcji płytek i dalsze konsekwencje kliniczne. W zależności od ekspresji syntetazy tlenu azotu (NOS) wykazano istnienie dwóch odrębnych subpopulacji płytek: NOS-pozytywnych i NOS-negatywnych, z których ostatnie mogą być odpowiedzialne za adhezję płytek do nieprawidłowo funkcjonującego śródbłona i promowania zakrzepów. Jednocześnie sugeruje się, że płytki NOS-pozytywne ograniczają opisany powyżej proces 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 centralnego układu nerwowego.

Przedstawiona do recenzji praca lek. Macieja Bładowskiego wpisuje się w określone powyżej nowoczesne trendy badawcze w udarach mózgu, istotnie poszerzając naszą wiedzę i rozumienie problemu. Podjęta przez Doktoranta tematyka wypełnia niebywale cenny postulat medycyny precyzyjnej, która w swojej istocie opiera się na ponadstandardowym opisie fenotypu pacjentów, w tym wypadku chorych wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego. Wyniki opublikowanych eksperymentów medycznych lek. Macieja Bładowskiego dają naukowe podstawy do dalszych prac klinicznych zmierzających do opracowania indywidualizacji profilaktyki udarów niedokrwiennych mózgu.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma układ formalny typowy dla tego rodzaju prac (cykl 2 publikacji) i wraz z załącznikami liczy 69 stron. Praca zawiera spis treści (wymaga korekty), wykaz publikacji składających się na dysertację, omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy, dwa anglojęzyczne artykuły opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, z których jeden upowszechnia wyniki eksperymentu medycznego, drugi natomiast stanowi krytyczny przegląd literatury w podejmowanym

temacie (obydwa pierwszego autorstwa Doktoranta). W skład pracy wchodzi także synopsis w języku polskim i angielskim, stosowne oświadczenia Współautorów opisane wymogiem Rozporządzenia MNiSW, dot. udziału merytorycznego w poszczególnych publikacjach, a także kopia opinii Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, w oparciu o którą przeprowadzono eksperyment medyczny.

Lektura dysertacji nie budzi istotnych zastrzeżeń merytorycznych i edytorskich. Tekst jest pisany klarownym językiem, pomimo wysoce specjalistycznej natury opisywanych badań. Lek. Maciej Bładowski wprowadza czytelnika w tematykę, kreśląc kontekst epidemiologiczny oraz mechanizmy patofizjologiczne, w oparciu o które sformułował hipotezy badawcze. Doktorant właściwie dobrał metodykę badawczą w odniesieniu do postawionych hipotez. Dociekania naukowe dotyczą biotransformacji tlenku azotu oraz funkcji płytek krwi u chorych w ostrej fazie niekardiogenego, niedokrwiennego udaru mózgu. Na uznanie zasługuje fakt, że koncepcja i przeprowadzenie doświadczenia wpisuje się w najnowsze trendy badawcze w medycynie, które dzięki postępowi technologicznemu promują precyzyjne opisy fenotypu pacjentów, istotnie wykraczając poza dzisiejszy standard kliniczny.

W pracy poglądowej: *Bładowski M, Gawrys J, Gajecki D, Szahidewicz-Krupska E, Sawicz-Bładowska A, Doroszko A. Role of the Platelets and Nitric Oxide Biotransformation in Ischemic Stroke: A Translative Review from Bench to Bedside. Oxid Med Cell Longev. 2020 Aug 28;2020:2979260. doi: 10.1155/2020/2979260. PMID: 32908630; PMCID: PMC7474795*, Autor rekapitułuje aktualny stan wiedzy z zakresu biotransformacji tlenku azotu w płytkach krwi i osoczu chorych z udarem niedokrwiennym mózgu. Scharakteryzowanie roli tlenku azotu w utrzymaniu homeostazy wewnątrznaczyniowej u pacjentów z niedokrwieniem mózgu stanowi bardzo cenną pozycję w przestrzeni publikacyjnej. Autor opisuje zależności jakie zaobserwowano pomiędzy obniżonym płytkowym stężeniem tlenku azotu (PDNO, ang. platelet-derived nitric oxide), a cechami antropometrycznymi i powszechnymi schorzeniami przewlekłymi. Co ciekawe, dotychczas nie analizowano zależności pomiędzy obniżonym PDNO, a rozwojem i przebiegiem

klinicznym udaru niedokrwiennego mózgu. Praca ta stanowi punkt wyjścia dla postawionych hipotez badawczych w planowanych eksperymentach medycznych Doktoranta.

Druga praca wchodząca w skład niniejszej rozprawy doktorskiej *Bładowski M, Szahidewicz-Krupska E, Wiśniewski J, Fortuna P, Chojdak-Łukasiewicz J, Budrewicz S, Fleszar M, Doroszko A. Changes in the Plasma and Platelet Nitric Oxide Biotransformation Metabolites during Ischemic Stroke-A Dynamic Human LC/MS Metabolomic Study. Antioxidants (Basel). 2022 May 12;11(5):955. doi: 10.3390/antiox11050955. PMID: 35624819; PMCID: PMC9137966*, stanowi pierwsze oryginalne doniesienie opisujące charakter i dynamikę zmian ekspresji osi biotransformacji tlenu azotu w płytkach krwi pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego niedokrwienia mózgu. Zważywszy na złożony charakter procesów biotransformacji tlenu azotu eksperyment zaplanowano tak, aby zweryfikować hipotezę zerową o braku różnic pomiędzy ekspresją metabolitów biotransformacji NO w osoczu i w płytkach krwi i ich funkcji, u pacjentów w ostrej fazie niekardiogenego, niedokrwiennego udaru mózgu, w porównaniu do grupy odniesienia. Ostatecznie badanie objęło 40 pacjentów spełniających kryteria włączenia i nie spełniających licznych kryteriów wyłączenia. Kontrolę stanowiła grupa pacjentów porównywalna pod względem profilu klinicznego i antropometrycznego, z niezaburzonym krążeniem w obrębie centralnego układu nerwowego. Autor podjął także wysiłek dopasowania grup pod względem prowadzonej przewlekłej farmakoterapii, co mogło mieć istotne znaczenie dla ocenianej biodostępności NO. Chorzy z udarem podlegali standardom opieki klinicznej właściwym dla tej choroby, w tym farmakoterapii przeciwplatekowej. Pacjentom zabezpieczono materiał celem oceny biotransformacji tlenu azotu w płytkach krwi i osoczu oraz wykonano pomiar parametrów agregacji płytek krwi w trzech punktach czasowych: (1) w ciągu pierwszych 24 godzin od początku objawów deficytów neurologicznych, (2) następnie w trzeciej dobie, oraz (3) w 7 dobie od początku objawów udaru. Jedyną różnicą w zakresie farmakoterapii porównywanych grup był fakt włączenia kwasu acetylosalicylowego u chorych z udarem. Należy także odnotować, że w grupie kontrolnej badania

biotransformacji NO przeprowadzono jednokrotnie, bez podawania ASA. Wykazano szereg różnic w zakresie stężeń L-argininy płytek i osocza, stężenia ADMA i SDMA pomiędzy grupami. Nadto wykazano korelacje pomiędzy płytek z płytkową dostępnością NO (korelacja -) oraz biodostępnością kompetycyjnego inhibitora NOS (korelacja +). Lek. Maciej Bładowski odnotował różną siłę opisanych związków, w zależności od czasu oznaczenia biochemicznego vs początek objawów udaru. Opisane różnice stężenia wybranych metabolitów biotransformacji NO na agregację płytek krwi, świadczą o istnieniu złożonej roli jaką odgrywa NO w patogenezie i przebiegu ostrego, niekardiogenego niedokrwienia mózgu. Autor skonstatował, że *„osoby z niekardiogenym udarem niedokrwiennym mózgu charakteryzują się wyższym stężeniem wewnątrz-płytkowych 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”*.

W dyskusjach obydwu publikacji Doktorant wykazał się biegłą znajomością podjętej tematyki, łatwością odnoszenia wyników swoich prac do opublikowanych danych zarówno historycznych jak i najnowszych, umiejętnością krytycznej interpretacji własnych odkryć oraz dyskusji spełniającej najwyższe standardy i praktyki naukowe. Jednym słowem dyskusja jest napisana w sposób logiczny i spójny, klaruje znaczenie przeprowadzonych badań i naukową istotę wyników. Bardzo cenię sobie wyważony analityczny język dyskusji oraz świadomość ograniczeń interpretacyjnych Doktoranta. W mojej ocenie, poczynione przez Autora odkrycia bez wątpienia przedstawiają istotną wartość naukową i torują drogę i rysują horyzont dalszych prac w przedmiocie. Jednocześnie, należy podkreślić, że z chwilą replikacji i walidacji wyników, odkrycia lek. Macieja Bładowskiego mają poważny, kliniczny potencjał aplikacyjny.

- I. Po zapoznaniu się z przedłożoną pracą w sposób naturalny nasuwa się pytanie, czy Doktorant / Zespół prof. Adriana Doroszki planuje próby walidacji wyników i dalszych prac nad fenotypem płytkowym pacjentów wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego?
- II. Ponadto, czy w opinii Doktoranta mamy wystarczające argumenty i narzędzia w postaci farmakoterapii, aby myśleć o zmianie zaleceń leczenia p/płytkowego w prewencji pierwotnej?

Obowiązkiem recenzenta jest całościowe spojrzenie na przedłożoną pracę, w tym na jej warstwy pozamerytoryczne. Doktorant wprawdzie nie ustrzegł się od drobnych potknięć edytorskich, jednakże są one nieistotne w całościowej ocenie pracy. Z tego powodu nie będę ich przytaczał.

Jednocześnie nie ukrywam, że recenzja przedstawionej pracy jest ułatwiona co najmniej z kilku powodów. Po pierwsze opracowanie skomponowane zostało wg nowych zasad formalnych dla układu prac doktorskich, tj. w formie opisu już opublikowanych prac w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Precyzując ten aspekt, dwie prace będące podstawą dysertacji zostały upowszechnione w uznanych przez środowisko periodykach naukowych tj. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* oraz *Antioxidants*, z czego obydwa mają wysoki współczynnik oddziaływania $IF > 6$. Po drugie, badania stanowią naturalną kontynuację przedmiotu badań prof. Adriana Doroszki, którego prace są szeroko rozpoznawalne i cytowane w świecie; Po trzecie, sama lektura pracy była przyjemna, gdyż Doktorant, pomimo konieczności stosowania hermetycznych dla przedmiotu pracy terminów ustrzegł się od techniczowanego języka. Ostatecznie, kompozycja, konsekwentna logiczność i klarowność prezentowanych treści i wyników nie pozostawiła mi pola do zarzutów.

Podsumowując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. nr 65 poz. 595

z późn.zm.) oraz §6 Rozporządzenia MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Przedstawiona rozprawa dowodzi obszernej wiedzy Kandydata do stopnia naukowego doktora, umiejętności samodzielnego prowadzenia prac badawczych, krytycznej oceny wyników, łatwości odniesienia obserwacji własnych do osiągnięć innych ośrodków prowadzących studia w temacie i umiejętności publikacyjnych w czasopismach medycznych uznawanych na całym świecie. Publikacje na łamach *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* oraz *Antioxydants* stanowią istotny głos w dyskusji nt. prewencji niekardiogenych udarów niedokrwiennych mózgu .

Mając na względzie powyższe, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, o dopuszczenie lek. Macieja Bładowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zważywszy także na fakt, że wyniki pracy zostały już opublikowane w prestiżowych czasopismach o zasięgu ogóln światowym oraz przełomowy charakter odkryć, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne o wyróżnienie pracy.

Dr hab. n. med. Jacek Wolf
specjalista ch. wewnętrznych
hipertensjolog
Nr rej. 1 3 7 9 1 4 9

Gdańsk, 08 października 2022 r.