

Wrocław, 28 lipca 2020r.

Recenzja rozprawy doktorskiej przygotowanej przez lek. med. Karolinę Marię Gawryś pod kierunkiem prof. dr. hab. Arkadiusza Derkacza

Praca doktorska lek. med. Karoliny Marii Gawryś zwrta została na 105 stronach wydruku, zilustrowana 20 rycinami i 13 tabelami.

Poza spisem treści, rycin i tabel Autorka zamieściła objaśnienia stosowanych skrótów i symboli, streszczenie w języku polskim i angielskim, zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań, a także informację, że część wyników pochodzi z grantu w programie Juventus Plus, realizowanego pod kierownictwem prof. dr. hab. Adriana Doroszki.

W dysertacji zamieszczono spis wykorzystanego piśmiennictwa w imponującej liczbie 397 pozycji. Na bibliografię składają się artykuły opublikowane w czołowych światowych czasopiśmie naukowych i w znakomitej większości stanowią przegląd osiągnięć z ostatnich lat.

Przystępując do oceny pracy zwróciłam uwagę nie tylko na wyjątkowo bogatą bibliografię, ale też wykaz skrótów i symboli 134 związków i elementów strukturalnych, które były przedmiotem badań bądź dyskusji. Wyobrażam więc sobie, jak wiele problemów napotkać musiała Autorka, aby zrealizować podjęte badania i zamknąć temat w określonych granicach, a także zachować właściwe proporcje między omawianymi zagadnieniami.

Myślę, że nie muszę podkreślać wagi podjętego tematu pracy. Jako neurolog mogę z całą mocą stwierdzić, że nigdy za dużo informacji prognostycznych, diagnostycznych, czy wreszcie terapeutycznych na temat niedokrwiennego udaru mózgu. To przecież bardzo zróżnicowany objawowo zespół chorobowy, będącym jednym z najczęstszych zabójców bądź sprawców inwalidztwa czy niesprawności ludzi w różnym wieku.

Jako fizjolog muszę zaś stwierdzić, że ocena funkcji płytek krwi w tych schorzeniu oraz ich proteomu to również ogromne wyzwanie. Jak wiadomo procesy fizjologiczne i patologiczne zachodzące w wypełnionych substancjami czynnymi płytkach w powiązaniu z reakcją ściany naczyniowej i białkami osocza to wzajemnie przenikające się kaskady procesów aktywacji i hamowania, odbywające się wedle procedury sprzężeń zwrotnych dodatnich i ujemnych w wielopłaszczyznowych kręgach regulacyjnych.

Biorąc pod uwagę fakt, że ocena merytoryczna dysertacji winna przede wszystkim skupić się na trafności podjętej problematyki badawczej i jej oryginalności, muszę z całą mocą stwierdzić, że recenzowana praca w całej rozciągłości spełnia te kryteria. Tekst pracy został w sposób typowy podzielony na rozdziały i podrozdziały z zachowaniem właściwej proporcji między rozdziałami wprowadzającymi czytelnika w zagadnienie badawcze, a więc wstępem i bardzo szczegółowo i obszernie potraktowaną „metodyką”, a wynikami badań i ich szczegółową analizą.

We wstępie Doktorantka przedstawiła najnowsze dane na temat niekardiologicznego niedokrwiennego udaru mózgu. Omówiła rolę płytek krwi w procesach homostazy, mechanizm adhezji, aktywacji i agregacji, a także ich udział w patofizjologii chorób sercowo-naczyniowych. Autorka odniosła się również do aktualnie znanych biomarkerów, a wreszcie opisała podstawy teoretyczne proteomiki, wchodzącej w skład bioinformatycznej dziedziny biologii. W przygotowaniu wstępu właściwie wykorzystano wiele pozycji piśmiennictwa, które prawidłowo cytowano. Schematy przedstawione we wstępie, ale nie tylko, przygotowane zostały nie tylko w oparciu o

dane bibliograficzne, ale we własnej modyfikacji, co świadczy nie tylko o znajomości przedmiotu badania, ale i dojrzałości Autorki.

Kolejny rozdział zatytułowany „Cel pracy” został przedstawiony przejrzyście, a hipotezy zerowe sformułowano poprawnie. Cel ten realizowano w oparciu o analizę badań zmienności proteomu oraz właściwości agregacyjnych płytek, jak i ich aktywacji prozapalnej w ostrej fazie udaru niedokrwiennego u 32 chorych w wieku 29-80 lat. Chorych tych rekrutowano w oparciu o „kryteria włączenia”. Do badań nie zakwalifikowano osób z zaburzeniami świadomości, co jak wskazuje sama Doktorantka, uniemożliwiło ocenę pełnego spektrum udaru mózgu. Komplet badań (płytki + parametry biochemiczne, pochodzące z osocza i surowicy) wykonano w pierwszej, trzeciej i siódmej dobie hospitalizacji chorych z udarem niedokrwiennym mózgu, co pozwoliło ocenić dynamikę ich zmian w ostrej fazie tego schorzenia. Chorzy leczeni byli w Klinice Neurologii 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką. Uzyskane wyniki porównywano z otrzymanymi w grupie kontrolnej, złożonej z 29 osób hospitalizowanych w tej samej jednostce służby zdrowia, charakteryzujących się zbliżoną demografią i obrazem biochemicznym (z wyjątkiem średniej masy HB w erytrocytach, białych krwinek, głównie neutrofilii, średniej objętości płytek krwi, glukozy, potasu i hormonu tyreotropowego). W grupie kontrolnej materiał biologiczny pobrany został jeden raz, w dniu uzyskania zgody na udział w projekcie.

Mnogość badanych parametrów stanowiła nie lada wyzwanie dla analizy statystycznej, zwłaszcza że większość oznaczanych wyników nie miała rozkładu normalnego. Wyniki uzyskane w trakcie badań poddano analizie statycznej z wykorzystaniem programu Statistica. Uważam, że zastosowane testy (Manna-Whitneya i ANOVA) oraz współczynnik korelacji Spearmana spełniły swoje zadanie. Nie tylko uzyskano wiarygodne różnice między i wewnątrzgrupowe jak i powiązano funkcje agregacyjne płytek krwi z parametrami biochemicznymi oraz morfologicznymi. Porównawcze wyniki badań zostały w sposób niezwykle czytelny przedstawione w tabelach i na rycinach.

Kolejny rozdział stanowi „Metodyka badań” opracowana niezwykle szczegółowo od momentu i sposobu pobrania krwi do uzyskania wyników końcowych. I tak opisano

- *badanie agregacji* płytek krwi metoda agregacji impedacyjnej z zastosowaniem aktywatorów agregacji (kolagen, ADP, kwas arachidonowy),
- *analizę proteomiczną*, dokonaną metodą dwuwymiarowej chromatografii cieczowej, połączonej z tandemową spektrometrią mas oraz
- *metodę oceny parametrów laboratoryjnych*, których źródłem było osocze i surowica krwi.

Analiza proteomiczna wykonana została w Laboratorium Spektrometrii MAs IBBPAN, oznaczone białka analizowano za pomocą oprogramowania Diffpot. Inne badania zostały wykonane w Laboratorium Szpitala Wojskowego.

Jak wspomniano wyżej uzyskane wyniki badań i ich analizę przedstawiono w tabelach i na rycinach, co pozwala czytelnikowi nie tylko znaleźć różnice, ale również ocenić ich wielkość. A różnice te znaleziono w proteomie płytek krwi osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną, jak i w proteomie ludzi chorych w kolejnych dobach trwania schorzenia. Jak pisze Doktorantka niniejsze opracowanie jest pierwszym, w którym oceniono zmiany zachodzące w proteomie ludzkich płytek krwi podczas ostrej fazy udaru niedokrwiennego mózgu. Tak więc na uwagę zasługuje fakt, że w toku tych pierwszych badań udało się wyodrębnić dziesięć białek lub grup białek, których stężenia w płytkach krwi istotnie różniły się między poszczególnymi grupami. Różnice wystąpiły również przy porównaniu właściwości agregacyjnych płytek krwi u osób z grupy kontrolnej i chorych w fazie ostrej udaru niedokrwiennego mózgu, ale także między badaniami tych właściwości w pierwszej, trzeciej i siódmej dobie trwania choroby. Wskazywać to może

na ważną rolę płytek w rozwoju i procesach naprawczych mózgu. W udarze niedokrwinnym wzrastał również potencjał pro-oksydacyjny, notowano wyższe wartości sP-selektyny i niższe stężenie tromboksanu.

Uzyskane wyniki badań zostały wnikliwie i krytycznie omówione w rozdziale „Dyskusja”. W rozdziale tym Autorka nie tylko uporządkowała informacje na temat otrzymanych przez siebie wyników badań, ale i skonfrontowała z uzyskanymi przez innych badaczy. Chciałam podkreślić, że w tym fragmencie pracy ujawniła się dojrzałość lek. med. Karoliny Marii Gawryś, wyrażająca się krytyczną ocenę nie tylko własnych wyników badań, ale i przedstawionych w publikacjach innych autorów. Wnioski oparte zostały wyłącznie na analizie wyników, uzyskanych podczas wykonanych przez siebie badań. Odpowiadają w pełni na postawione pytanie, falsyfikując hipotezy zerowe.

Dojrzałość Autorki po raz kolejny ujawniła się w treści rozdział „Ograniczenia pracy”. Uważam, że jej samoocena jest zbyt surowa. Uważam też, że dysertacja ma charakter pracy spustowej (*trigger task*), która stanie się inspiracją do dalszych poszukiwań nowych, wiarygodnych biomarkerów udaru niedokrwinnego mózgu, jego rozwoju, ryzyka i terapii.

Muszę także zwrócić uwagę na niezwykle staranną szatę edytorską i fakt, że wiele fragmentów tekstu (m. in. we wstępie czy w omówieniu wyników) może być publikowanych jako prace poglądowe lub rozdziały w skryptach i podręcznikach. Proponuję jednak ograniczenie tekstu i cytowań, żeby uniknąć „przegadania” wynikającego z nadmiaru informacji.

Przygotowując pracę Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów, głównie natury językowej, czy drobnych pomyłek, które w niczym nie umniejszają walorów pracy. Nie przytaczam ich, ponieważ omówię je z Autorką przed publikacją pracy. W tytule zastąpiłabym słowo „pacjent” słowem „chory”, pozostawiając *pacjenta* NFZ-owi lub statystyce szpitalnej.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przygotowaną przez lek. med. Karolinę Marię Gawryś rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki”. Niech mi wolno będzie zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. med. Karoliny Marii Gawryś do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na ogrom włożonej pracy i perfekcyjne przygotowanie, proponuję również jej nagrodzenie.

prof. dr hab.  Nadzieja