

Prof. dr hab. n. med. Agata Stanek
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych,
Angiologii i Medycyny Fizykalnej
Śląski Uniwersytet Medyczny
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze
ul. Batoiego 15
41-902 Bytom

Bytom, 28.12.2020

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Jakuba Jasiczka
pt. „Wpływ układu RAA na wybrane funkcje śródbłonna i płytek krwi
u osób zdrowych oraz z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym”**

Promotor: dr hab. Małgorzata Trocha

Podstawę opracowania recenzji przez mnie stanowi otrzymane pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr RN-BM/1562/2020 z dnia 24.11.2020 i przekazana rozprawa doktorska.

Ze względu na rozległe i wielonarządowe działanie układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA), jego nadmierna aktywacja przyczynia się do rozwoju wielu chorób, a w szczególności schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Stąd badania nad mechanizmami związanymi z regulacją układu RAA i poszukiwania nowych strategii terapeutycznych, nadal są prowadzone. Dlatego też wybór tematu pracy Doktoranta uważam za bardzo istotny.

Rozprawa doktorska lek. Jakuba JASICZKA ma układ typowy, obejmuje 120 stron. Składa się ze wstępu, szczegółowego określenia celu pracy, części szczegółowej omawiającej materiał i metody badania, wyników, omówienia wyników i dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim, angielskim oraz zgody Komisji Bioetyki, zgody kierownika projektu, spisu rycin i tabel, przeglądu bibliografii. Praca napisana jest poprawnie pod względem formalno – językowym i stylistycznym.

Proporcje na poszczególne rozdziały zostały należycie wyważone.

We „Wstępie” Doktorant umiejętnie i kompetentnie wprowadza czytelnika w problematykę badań i uzasadnia motywację ich podjęcia. Jasno i wyczerpująco przedstawia zarówno podstawowe dane na temat układu Renina-Angiotensyna-aldosteron (RAA), tkankowego systemu RAA, leków modulujących aktywność RAA oraz fizjologii oraz patofizjologii śródbłonna naczyniowego, a także płytek krwi.

Celem głównym rozprawy doktorskiej była wpływ jednej z grup leków modyfikujących aktywność układu RAA – walsartanu na fenotyp funkcji śródbłonna u osób z izolowanym pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, a także analiza powiązań pomiędzy aktywnością i reaktywnością układu RAA a profilem funkcji śródbłonna – zarówno u osób normotensyjnych, jak i chorych z nadciśnieniem tętniczym.

Do realizacji celu głównego Doktorant wyznaczył następujące cele szczegółowe:

1. Ocenę wpływu ARB na biodostępność tlenku azotu rozumianą jako wypadkowa jego syntezy (stężenie L-Arg jako substratu dla eNOS oraz jej inhibitora kompetycyjnego – asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA; ang. asymmetric dimethylarginine)) i degradacji (produkcja nadtlenoazotynów i następcza nitracja reszt tyrozynowych).
2. Ocenę wpływu walsartanu na aktywność i reaktywność wybranych elementów kaskady kwasu arachidonowego poprzez oznaczenie dwóch kluczowych jej produktów: tromboksanu B2 (TxB2; ang. thromboxane B2) – markera aktywacji zapalnej i agregacyjnej płytek krwi oraz 6keto-PGF-1alfa – markera przeciwzapalnej funkcji śródbłonna.
3. Badanie roli walsartanu w modulowaniu funkcji pro- i przeciwzapalnej, jak również prozakrzepowej i angiogennej śródbłonna ocenionej za pomocą takich markerów, jak sE-selektyna, wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna (forma rozpuszczalna) (sICAM1; ang. soluble intercellular adhesion molecule-1), cząsteczka adhezyjna 1 komórek naczyń, forma rozpuszczalna (sVCAM1; ang. soluble vascular cell adhesion molecule), PAI-1 i czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (forma rozpuszczalna) (sVEGF; ang. soluble vascular endothelial growth factor) .
4. Analizę roli walsartanu w modyfikowaniu właściwości naczyniorozszerzających śródbłonna ocenionych metodą wazodylacji zależnej od przepływu (FMD), według protokołu Celermajera.

5. Ocenę wpływu walsartanu na właściwości płytek krwi ocenione poprzez:
- oznaczenie markerów ich aktywacji (sP-selektyny i TxB₂)
 - badania agregacji zależnej od kwasu arachidonowego (szlaku cyklooksygenazy), adenylozynodifosforanu (ADP, ang. adenosine diphosphate) – szlaku aktywacji zależnego od receptora purynergicznego P₂Y₁₂ i czynnika von Willebranda metodą agregometrii impedacyjnej.

Cele główne oraz cele szczegółowe pracy zostały trafnie określone i jasno sformułowane.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera wszelkie konieczne informacje niezbędne dla zorientowania się w sposobie przeprowadzania badania. Doktorant zastosował odpowiednie i nowoczesne metody diagnostyczne gwarantujące rzetelność uzyskanych wyników.

Doktorant uzyskał na przeprowadzenie badania zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Należy podkreślić, że rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektu Wrovasc – Zintegrowanego Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, jako projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013. POIG.01.01.02-02-001/08, którego Doktorant był współwykonawcą.

Doktorant do badania włączył 101 osób:

- 31 pacjentów między 18 a 40 rokiem życia, z rozpoznaniem izolowanym pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (hospitalizowanych z tego powodu w Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2012-2016)
- 70 normotensyjnych ochotników dobranych do pacjentów z nadciśnieniem tętniczym pod względem demograficznym, które zostały podzielone na 3 tercyle wyodrębnione w oparciu o wartości wskaźnika aldosteronowo-reninowego (Grupy N I, N II, N III).

Od każdego normotensyjnego pacjenta materiał biologiczny pobierany był dwukrotnie: podczas pierwszej wizyty rekrutacyjnej (badanie A) oraz w piątą dobę,

po czterech dniach przyjmowania ASA (75mg/24h) (badanie B). Natomiast od osób z nadciśnieniem tętniczym czterokrotnie – A i B jak wyżej oraz dodatkowo po dwóch tygodniach terapii walsartanem (80 mg/24h) – (badanie C), a następnie po czterech dniach przyjmowania ASA (75 mg/24h) z walsartanem jednocześnie (badanie D).

Oceniano następujące parametry: morfologię, współczynnik tiolowy, parametry krzepnięcia, stężenia kreatyniny, glukozy, mocznika, kwasu moczowego, sodu, potasu, hsCRP, lipidogramu, metabolitów szlaku tlenu azotu, nitrotyrozynę, końcowych produktów kaskady kwasu arachidonowego, markery aktywacji śródbłonna (selektynę E, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), wewnątrzkomórkową molekułę adhezyjną (sICAM-1), cząsteczkę adhezyjną 1 komórek naczynia (sVCAM-1)), stężenie aldosteronu, aktywność reninową osocza (ARO), wskaźnik aldosteronowo-reninowy.

Na podstawie stężenia kreatyniny, płci i wieku oszacowany został współczynnik filtracji kłębuszkowej (eGFR). Dodatkowo, każda grupa podczas wszystkich wizyt miała wykonane badanie wazodylatacji zależnej od przepływu-FMD wyjściowo oraz po dożylnym podaniu 16,0 g L-Arg w bolusie. U badanych oceniano również sztywność naczyń oraz agregację płytek krwi pełnej.

Uzyskane wyniki poddane zostały właściwie dobranej i przeprowadzonej analizie statystycznej. Wyniki badań zostały przedstawione w postaci starannego opracowania z wykorzystaniem tabel i rycin wraz z ich szczegółowym omówieniem. Praca jest przejrzysta i umożliwia pełną interpretację uzyskanych rezultatów.

Doktorant uzyskał następujące wyniki:

Nie wykazał istotnego wpływu stosowanego walsartanu i ASA na funkcję wazodylatacyjną śródbłonna oraz parametry biodostępności tlenu azotu u osób z NT. W grupie pacjentów z NT terapia walsartanem spowodowała wzrost wartości ARO jednak bez spadku stężenia aldosteronu. Zastosowanie ASA skutkowało zatarciem istniejących uprzednio istotnych różnic pomiędzy grupami wskutek wzrostu ARO w grupie z najwyższymi wartościami ARR.

Doktorant obserwował wyższe wartości sICAM-1 w grupie osób z NT, tak jak przypadku sE-selektyny. Włączenie walsartanu nie spowodowało żadnych zmian w stężeniu tego parametru, podobnie jak sVCAM-1. Ponadto stwierdził wyższe

stężenie PAI-1 u osób z nadciśnieniem tętniczym sugeruje, natomiast nie zaobserwowano wpływu walsartanu ani ASA na stężenie tego parametru. Stężenie 6-keto-PGF1-alfa, było niższe u osób z NT, dodatkowo stwierdził wielokrotniony spadek 6-keto-PGF1-alfa po jednoczesnym zastosowaniu ASA i walsartanu. Stężenia VEGF nie różniły się między grupami. W każdej badanej grupie Doktorant obserwował spadek stężenia tromboksanu w odpowiedzi na podanie ASA. Zastosowanie ASA spowodowało istotny spadek agregacji zależnej od cyklooksygenazy oraz od czynnika von Willebranda. W niniejszym badaniu Doktorant nie wykazał, aby zdolność do agregacji płytek zależnej od ADP, cyklooksygenazy i czynnika von Willebranda różniła się pomiędzy tercylami w podgrupach osób normotensyjnych, nie zależała więc od stopnia aktywacji układu RAA. Doktorant nie wykazał także, by obecność NT wpływała na nasilenie agregacji płytek krwi.

Z obowiązku recenzenta podaję również moje uwagi krytyczne, które nie wpływają na wysoką wartość pracy:

- Str 41 metodę oznaczania parametrów biochemicznych należałoby by podać w rozdziale pobieranie materiału biologicznego. Ułatwiłoby to czytelnikowi sprawniejsze zorientowanie co było, gdzie oznaczane w surowicy, krew pełna, czy osoczu.
- W rozdziale 5 sekcji „Materiał i Metody”, należałoby wyodrębnić ponumerowane podrozdziały i umieścić je w spisie treści, co ułatwiłoby czytelnikowi łatwiejsze znalezienie oznaczania danego parametru,
- Dobrze było by także wyodrębnić podobne podrozdziały w sekcji „Materiał i Metody”, jak w wynikach z uwzględnieniem badanych parametrów.
- Oznaczanie nitrotyrozyny lepiej byłoby umieścić po metodyce oznaczania metabolitów szlaku tlenu azotu jako markera biodegradacji tlenu azotu.
- Dysponując tak dużą ilością wyników warto je dla przejrzystości podsumować w dodatkowym podrozdziale poprzedzającym dyskusję.

W interesującej, bardzo wnikliwej „Dyskusji” Doktorant porównał własne obserwacje i wyniki z danymi uzyskanymi z literatury. Cytowane piśmiennictwo w tej części pracy obejmuje aktualnie publikowane prace z tego zakresu. Dyskusja ta jest obszerna i bardzo dojrzała naukowo.

Podsumowaniem pracy jest 5 wniosków, które wynikają ściśle z przeprowadzonych badań. Brakuje wniosku głównego podsumowującego przeprowadzone badania.

Przegląd piśmiennictwa opracowany został w oparciu o 388 pozycje literaturowe dobrze dobrane i zacytowane, w większości z ostatnich lat. Doktorant posiada dużą znajomość literatury przedmiotu.

Przystępując do oceny całości stwierdzam, że praca lek. Jakuba JASICZKA stanowi wartościowe i nowatorskie osiągnięcie naukowe. Przedstawione uwagi krytyczne wyrażone w niniejszej recenzji nie wpływają na moją wysoką ocenę rezultatów przedstawionych w pracy. Powyższa rozprawa doktorska stanowi studium z zakresu medycyny translacyjnej, definiując dość precyzyjnie molekularne mechanizmy działania walsartanu - leku dość szeroko stosowanego w praktyce klinicznej. Doktorant w swojej pracy przedstawił szczegółową analizę powiązań czynnościowych układu RAA, szlaku cyklooksygenazy i wybranych elementów szlaku biotransformacji tlenu azotu między sobą w warunkach fizjologicznych jak i w przebiegu niepowikłanego samoistnego nadciśnienia tętniczego, co ma istotne znaczenie w praktyce klinicznej. Należy podkreślić, że uzyskane przez Doktoranta wyniki pozwalają nie tylko na pogłębienie wiedzy z tego zakresu, ale przede wszystkim umożliwiają optymalizację farmakoterapii u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Jakuba JASICZKA spełnia warunki kryteriów wyznaczonych przez aktualnie obowiązujące przepisy określone art.187 ustawy z dnia 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 poz.85 z późn.zm) w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie dysertacji pt. „Wpływ układu RAA na wybrane funkcje śródbłonna i płytek krwi u osób zdrowych oraz z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym” jako rozprawy doktorskiej, dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu na stopień doktora nauk medycznych oraz wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.

