

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

Ocena rozprawy doktorskiej lekarza Jakuba Gawrysia „Wpływ wewnątrz-płytkowej regulacji biodostępności tlenu azotu na reaktywność płytek krwi na leki przeciw-agregacyjne u chorych z cukrzycą typu 2”.

Cukrzyca typu 2, pomimo znacznego rozwoju działań profilaktycznych oraz postępu w zakresie diagnostyki i leczenia w ostatnich dekadach, stanowi coraz większy problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny w Polsce i na świecie. Częstość występowania cukrzycy typu 2 stale wzrasta, co przełoży się na większą liczbę powikłań sercowo-naczyniowych w przyszłości. Należy podkreślić, że zgodnie z obowiązującymi standardami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego, zdecydowana większość pacjentów z cukrzycą typu 2 charakteryzuje się wysokim lub bardzo wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowego. Warto zaznaczyć, że leczenie przeciwplatek jest stosowane w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych szczególnie w profilaktyce wtórnej. Biorąc pod uwagę coraz większą grupę pacjentów z rozpoznaną cukrzycą i potencjalną liczbę powikłań, jednym z kluczowych pytań jest pytanie o stosowanie leczenia przeciwplatekowego w profilaktyce pierwotnej zdarzeń sercowo-naczyniowych w tej grupie pacjentów. Dotychczas brak jest jednoznacznych dowodów potwierdzonych w dużych badaniach o skuteczności leczenia przeciwplatekowego. Z drugiej strony dowiedziono, że wśród czynników mogących odpowiadać za powstawanie naczyniowych powikłań cukrzycy wymienia się zwiększoną aktywność i agregację płytek krwi oraz zmiany w interakcji pomiędzy trombocytami i komórkami śródbłonka naczyniowego. W związku z tym, mechanizmy patofizjologiczne odpowiadające za zmienioną funkcję płytek krwi przy zaburzeniach metabolizmu glukozy wymagają szczególnie dokładnego poznania celem znalezienia nowych strategii terapeutycznych w tej grupie chorych.

Tlenek azotu oraz regulacja jego biodostępności odgrywają kluczową rolę w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego. Wiele badań podkreśla szczególną rolę asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), kompetycyjnego inhibitora syntazy tlenu azotu, którego zwiększone stężenie w osoczu jest wczesnym niezależnym wskaźnikiem wyższego ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych w przyszłości. Obecność asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) stwierdzono nie tylko w kompartmentcie zewnątrzkomórkowym, ale także wewnątrz komórek śródbłonka naczyniowego oraz w płytkach krwi. Po wykazaniu niedawno istnienia dwóch odrębnych subpopulacji płytek krwi w organizmie człowieka różniących się ekspresją syntazy tlenu azotu (NOS) - płytek NOS pozytywnych

i NOS negatywnych - przełamany został dotychczasowy dogmat braku syntezy tlenu azotu w elementach morfotycznych krwi. Wykazanie powyższych różnic znajduje bezpośrednie przełożenie na ich gotowość do inicjowania incydentów zakrzepowo-zatorowych *ex vivo*, ale też – z praktycznego punktu widzenia - w różnych łożyskach naczyniowych, co może mieć bardzo poważne implikacje kliniczne.

Wobec tak aktualnej tematyki, jaką w szerokim pojęciu stanowi leczenie przeciwplatek w szczególnie obciążonej grupie chorych na cukrzycę typu 2, badania przeprowadzone przez lekarza Jakuba Gawryśa ciekawie wpisują się w dotychczasowe opracowania w tej dziedzinie i posiadają znaczenie poznawcze. Należy podkreślić, że badania zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. n. med. Adriana Doroszko, profesora nadzwyczajnego UMW, który jest niewątpliwym ekspertem w tej dziedzinie.

Wykazanie klinicznie różnic ekspresji szlaku tlenu azotu i jego biotransformacji może okazać się przełomem zmieniającym dotychczasowe podejście do leczenia przeciwplatekowego (zamiast nieselektywnego blokowania „na ślepo” aktywacji płytek NOS-negatywnych, leczenie powinno być celowane na zmianę proporcji subpopulacji płytek w krwi krążącej i przywrócenia fizjologicznego odsetka płytek NOS- pozytywnych, które mają zdolność do hamowania kaskady agregacyjnej).

Dlatego też, lekarz Jakub Gawryś jako główny cel badań będących przedmiotem pracy doktorskiej założył ocenę zaburzenia wewnątrzplatekowego metabolizmu tlenu azotu u osób z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym, w tym u chorych na cukrzycę typu 2, mogących być odpowiedzialne za obserwowaną oporność tej grupy chorych na leczenie przeciwplatekowe.

Rozprawa doktorska lekarza Jakuba Gawryśa ma formę spójnego tematycznie cyklu dwóch artykułów (jeden oryginalny i jeden poglądowy). Prace zostały opublikowane w międzynarodowym, recenzowanym czasopiśmie naukowym (*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*) o wysokim współczynniku oddziaływania (IF za 2019 rok 5.076). Należy podkreślić, że w obydwu publikacjach doktorant jest pierwszym autorem. Łączna punktacja publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej (współczynnik oddziaływania Impact Factor 10.152 oraz 200 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Należy zaznaczyć, że pomimo tylko dwóch prac wchodzących w cykl, ich punktacja jest bardzo wysoka, co pozwala stwierdzić wysoką wartość poznawczą prezentowanych wyników.

Rozprawa doktorska lekarza Jakuba Gawryśa liczy 51 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 – 486/2018) przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu z dnia 10 września 2018 roku na przeprowadzenie badania.

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

Uzyskane wyniki oraz dyskusja zostały zawarte w przykładowo napisanych publikacjach, które składają się na rozprawę doktorską lekarza Jakuba Gawryśia. Cykl artykułów oparty został na wiedzy Doktoranta z zakresu oceny wpływu wewnątrzpłytkowej regulacji biodostępności tlenu azotu na reaktywność płytek krwi na leki przeciwplatekowe, które zaowocowały dwoma artykułami, jednym poglądowym i jednym oryginalnym.

Pierwsza z prac: „Intrplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Metabolic Pathway: From Discovery to Clinical Implications in Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders” opublikowana w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2020, Article ID 1015908, doi:10.1155/2020/1015908 stanowi bieżące podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat mechanizmów wpływających na metabolizm tlenu azotu. Należy podkreślić, że powyższy artykuł jest jednym z niewielu dostępnych w literaturze przekrojowych zbiorów informacji dotyczących dokładnej roli tlenu azotu w utrzymaniu homeostazy wewnątrznaczyniowej oraz zaburzeń jego biotransformacji w niektórych schorzeniach. Praca przedstawia i systematyzuje w szerokim zakresie zapoczątkowane przez zespół, w którym pracuje lekarz Jakub Gawryś, badania w zakresie biotransformacji tlenu azotu w płytkach krwi, przedstawiając potencjalne implikacje w praktyce klinicznej. Warto zaznaczyć, że artykuł poglądowy, którego pierwszym autorem jest doktorant, w sposób klarowny porządkuje wiedzę, a wykonane ryciny, w liczbie czterech ułatwiają przyswojenie tej bardzo dużej ilości wiedzy. Dane zawarte w artykule potwierdzają, że pacjenci z cukrzycą typu 2 charakteryzują się zmniejszoną produkcją tlenu azotu oraz cGMP przy stałej ekspresji syntazy tlenu azotu. Stężenie cGMP – drugiego przekaźnika wewnątrzkomórkowego w układzie metabotropowym transdukcji zależnym od kinazy białkowej G (PKG), dzięki której realizowane są efekty działania NO, jest odwrotnie proporcjonalne do glikemii oraz stężenia (miano to rozcieńczenie) hemoglobiny glikowanej. W związku z tym, czy zaburzenie produkcji tlenu azotu przez płytki krwi może być związane z zależnym od glikemii zmniejszeniem aktywności syntazy tlenu azotu?

Autor postanowił odpowiedzieć na powyższe pytanie planując stosowne badanie u chorych na cukrzycę typu 2. Wyniki opublikował w artykule wchodzącym w cykl pracy doktorskiej pt: „Increased Intrplatelet ADMA Level May Promote Platelet Activation in Diabetes Mellitus” w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2020, Article ID 6938629, doi: 10.1155/2020/6938629. Celem badania była ocena czy istnieją różnice w ekspresji elementów osi biotransformacji tlenu azotu w płytkach krwi oraz funkcji trombocytów u chorych na cukrzycę typu 2 w porównaniu do grupy kontrolnej. W tym celu zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej oceniono osoczowe i wewnątrzpłytkowe elementy osi biotransformacji tlenu azotu, funkcję agregacyjną płytek oraz nasilenie demograficznych, biochemicznych i zmierzonych za pomocą badań czynnościowych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Do badania zostało włączonych 31 osób z cukrzycą typu 2,

w fazie leczenia doustnego, bez klinicznie istotnych powiązanych z cukrzycą uszkodzeń narządowych. Grupę kontrolną w ilości 30 osób stanowili zdrowi ochotnicy, dopasowani demograficznie do grupy badanej, u których wykluczono zaburzenia metabolizmu glukozy. Głównym wynikiem badania było stwierdzenie wyższego stężenia ADMA w płytkach krwi chorych na cukrzycę typu 2, przy braku różnic w stężeniu ADMA w osoczu. Następnie wykonano ocenę zależnej od tlenu azotu funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna za pomocą obwodowej tonometrii tętnicznej - EndoPAT 2000 oraz badań przepływowymierzem laserowym - Laser Doppler Flowmetry (LDF) u wszystkich uczestników projektu. Wykazano zmniejszoną odpowiedź mikronaczyniową na bodziec termiczny mierzoną za pomocą LDF u osób z cukrzycą, przy braku różnic w reakcji na czasowe niedokrwienie mierzonej z użyciem EndoPAT, co w połączeniu z doniesieniami innych autorów wskazuje na LDF jako bardziej czułą metodę oceniającą funkcję mikrokrążenia.

Podsumowując wyniki, wykazano, że osoby z cukrzycą typu 2 charakteryzują się wyższym stężeniem wewnątrzpłytkowej asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) w porównaniu z osobami zdrowymi, co może skutkować upośledzeniem wytwarzania płytko-pochodnego tlenu azotu (PDNO, ang. platelet-derived nitric oxide) i tym samym sprzyjać zwiększonej reaktywności trombocytów wyrażonej jako agregacja indukowana ADP. Otrzymane wyniki pozwalają na sformułowanie wniosku, że jedną z przyczyn zmniejszonej skuteczności kwasu acetylosalicylowego w zarówno pierwotnej, jak i wtórnej farmakoprophylaktyce zdarzeń sercowo-naczyniowych w tej grupie chorych są zmiany stężenia ADMA w środowisku wewnątrz-płytkowym zachodzą na wcześniejszym etapie choroby niż zmiany stężenia tego inhibitora w osoczu. Badanie przepływu mikronaczyniowego w skórze za pomocą Laser Doppler Flowmetry jest czułym testem wskazującym na upośledzenie wazodylatacji łożyska mikronaczyniowego u chorych na cukrzycę jeszcze przed rozwojem klinicznie jawnych, istotnych powikłań narządowych choroby.

Wyniki prezentowane przez Doktoranta są przykładem powiązania zmian biochemicznych na poziomie subkomórkowym z oceną czynnościową, którą można wykorzystać w codziennej praktyce lekarskiej, stanowiąc tym samym przykład zastosowania medycyny translacyjnej. Ponadto, biorąc pod uwagę znaczenie profilaktyki pierwotnej i wtórnej przy pomocy leków przeciwplateletowych, szczególnie w grupie chorych z wysokim i bardzo wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym zdarzeń sercowo-naczyniowych zasadne wydaje się przeprowadzenie badań klinicznych z użyciem leków przeciwplateletowych o odmiennym mechanizmie działania jak kłopidogrel, czy inne inhibitory receptora P2Y₁₂ lub poszukiwanie nowych substancji o nieznanym dotychczas punkcie uchwytu.

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.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską lekarza Jakuba Gawrysia 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. Ponadto, korekty wymaga w wyżej wymienionej części użycie słowa „ilość” pacjentów. Proponowałbym, zastąpić je liczbą pacjentów, gdyż jest to rzeczownik policzalny. Korekty wymaga stosowanie terminu „cukrzyk” poprzez zastąpienie go „chory na cukrzycę typu 2”. Nie umniejsza to wysokiej oceny przedstawionej do recenzji dysertacji.

Lektura publikacji wchodzących w skład cyklu nasunęła mi również pytanie, będące również propozycją kontynuacji analiz. Czy zdaniem Doktoranta ocena wpływu wewnątrzplytkowej regulacji biodostępności tlenu azotu na reaktywność płytek krwi na leki przeciwplytkowe powinno być zalecane u większej liczby chorych, szczególnie u tych bardzo wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego? Otrzymane wyniki zachęcają do włączenia tego typu badania w celu wczesnego zapobiegania kolejnym zdarzeniom sercowo-naczyniowym w tych grupach chorych. Ponadto, mam kolejne pytanie, czy Doktorant po złożeniu do publikacji otrzymanych wyników, rozpoczął już badania z użyciem leków przeciwplytkowych o odmiennym mechanizmie działania jak kłopidogrel, czy inne inhibitory receptora P2Y12? Na pewno takie badania przyczynią się do rozwoju wiedzy, ale w przypadku pozytywnych wyników do poprawy rokowania sercowo-naczyniowego pacjentów.

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 Jakuba Gawrysia wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza Jakuba Gawrysia do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o jej wyróżnienie.

Wawrzysz,
31.12.2020
Piotr Dobrowolski

dr hab. n. med. Piotr Dobrowolski
specjalista kardiolog
PWZ 2312184