

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Aleksandry Turek-Jakubowskiej  
pt. „Dynamiczna ocena wybranych aspektów patofizjologii świeżego udaru  
niedokrwiennego mózgu ze szczególnym uwzględnieniem zmian proteomu osocza”  
powstałej w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia  
Tętniczego i Onkologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.**

Choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. cardiovascular disease, CVD) stanowią wiodący problem zdrowotny w populacji światowej. Spośród wszystkich postaci CVD, choroby naczyń mózgowych są w Polsce drugą po chorobie niedokrwiennej serca przyczyną zgonów i trwałej niepełnosprawności.

Udar mózgu jest coraz częściej określany mianem "ostrego zespołu mózgowego", co podkreśla analogię do ostrego zespołu wieńcowego. W związku z tym wykrycie biochemicznych markerów uszkodzeń mózgu powinno nieść podobne korzyści (wartość diagnostyczną i prognostyczną), jak oznaczanie stężenia troponin lub CK-MB w zawale mięśnia sercowego. Pomimo to nadal brakuje markerów ostrego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego znajdujących zastosowanie w praktyce klinicznej – odpowiednio czułych i swoistych, ściśle korelujących z rozległością ogniska niedokrwienego, pokazujących dynamikę zmian w czasie oraz pozwalających rozpoznać powtarzający się incydent niedokrwienia wcześniej niż badania obrazowe. Dodatkowym problemem jest brak efektywnych leków pozwalających nie tylko na zahamowanie postępu choroby, ale również na odwrócenie jej skutków, zarówno u pacjentów z ostrym udarem niedokrwienym mózgu, jak i przewlekłą chorobą naczyniową mózgu, która obok choroby Alzheimera, stanowi drugą przyczynę otępienia. Nowoczesna terapia powinna polegać nie tylko na leczeniu objawów, jak było to powszechnie rozumiane przez wiele lat, lecz także na wielokierunkowym leczeniu przyczyn i następstw zgodnie z zasadami medycyny opartej na faktach. Konieczne jest zatem definiowanie nowych strategii terapii w oparciu o zebrane dane z badań przeprowadzonych na poziomie molekularnym z wykorzystaniem między innymi metod proteomicznych. Znajomość molekularnych podstaw działania leków w powiązaniu z patofizjologią stanów chorobowych jest więc kluczem do opracowania optymalnej terapii celowanej na jednostkę

chorobową, jaką jest udar niedokrwienny, przy jednoczesnym zachowaniu stosunkowo wąskiego spektrum działań ubocznych takiego leczenia.

Dotychczas w praktyce klinicznej nie wykorzystuje się biomarkerów niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego (OUN), które by w podobny sposób jak troponiny sercowe charakteryzowały ostry zespół neurologiczny. W obecnej dysertacji lekarz Aleksandra Turek-Jakubowska pod opieką Pana Docenta Adriana Doroszko podjęła niezwykle trudne, ale jednocześnie bardzo ważne wyzwanie - poszukiwanie biomarkerów przydatnych w szybkiej diagnostyce ostrej fazy udaru niedokrwiennego. Praca wpisuje się w nurt tworzonego w Polsce programu leczenia udarów mózgu.

Przedstawiona do recenzji praca napisana jest jasno, pod względem redakcyjnym nie budzi zastrzeżeń, a proporcje pomiędzy poszczególnymi działami są praktycznie zachowane. Zwróciłem jednak uwagę na dość długi wstęp po jego wnikliwej lekturze czytający otrzymuje możliwość wyczerpującego zaznajomienia się z tak interesującym i trudnym tematem. Prezentowane dane podparte są bardzo starannie i nowocześnie przygotowanymi tabelami i rycinami.

W części **Wstęp** Doktorantka w szerokim zakresie przedstawia stan wiedzy dotyczący czynników ryzyka udaru niedokrwiennego oraz ogólne zasady diagnostyki i postępowania w tej jednostce chorobowej. Należy podkreślić, że lekarz Aleksandra Turek-Jakubowska powołuje się na najnowsze, opublikowane w czasopiśmie Stroke w 2018 roku zalecenia postępowania z pacjentami ze świeżym udarem mózgu. Bardzo skrupulatnie opisuje patofizjologię udaru mózgu i co ważne ograniczenia obecnie stosowanych metod diagnostyczno-terapeutycznych. W dalszej części wstępu Doktorantka szczegółowo omawia podstawy proteomiki i jej zastosowanie w diagnostyce incydentów niedokrwiennych w OUN. Wstęp kończy akapit dotyczący funkcji śródbłonna, technik oceny jego dysfunkcji ze szczególnym uwzględnieniem metody Laser Doppler. Uwagi szczegółowe do tej części pracy dotyczą uzupełnienia podpisu Ryciny 1 i Tabeli 1, brakuje precyzyjnego wskazania źródła. Według recenzenta, uszczegółowienia wymaga rozwinięcie skrótu NIHSS pod Ryciną 3: jest to skala udarowa Amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia, co powinno być doprecyzowane. Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć również o nielicznych uchybieniach literowych w tej części tekstu. Ponadto niewielkiej korekty wymaga część **Spis**

**Treści** - w jego początkowej części znajduje się objaśnienie skrótów i symboli. Sugeruję pozostawienie wyłącznie objaśnienie skrótów, ponieważ nie znalazłem w tekście żadnego symbolu wymagającego wyjaśnienia. Punkt 3- Doktorantka zatytułowała Materiały i Metody- opisując w nim tylko materiał. Proponuję zatem usunięcie z tytułu słowa Metody, gdyż punkt 4 odnosi się do METOD. Powyższe uwagi nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny Wprowadzenia, stanowiącej poprawną naukową podstawę dysertacji.

**Celem** głównym pracy była identyfikacja białek – o potencjalnej przydatności jako biomarkery ostrego niedokrwienia mózgu, przez analizę różnic proteomu i peptydomu osocza pomiędzy grupą badana a kontrolną, jak również dynamiczna ocena zmian tych parametrów w obrębie grupy osób z udarem niedokrwienym mózgu w szeregach czasowych. Uzupełniająco przeprowadzono analizę czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych oraz fenotypu funkcji śródbłónka w grupie badanej i kontrolnej. Realizując poszczególne cele badawcze, doktorantka poddała próbie falsyfikacji trzy hipotezy zerowe:

1. Brak istotnych różnic w proteomie surowicy osób z udarem niedokrwienym mózgu w porównaniu z grupą kontrolną.
2. Brak istotnej dynamiki zmian w proteomie surowicy osób z udarem niedokrwienym mózgu w wyznaczonym szeregu czasowym.
3. Brak istotnych różnic fenotypu funkcji śródbłónka między osobami zdrowymi i pacjentami z objawami udaru niedokrwienego mózgu oraz brak jego zmian w czasie w zależności od występowania udaru.

Postawione cele są w pełni aktualne, ważne z punktu widzenia poznawczego i klinicznego, a wyodrębnienie hipotez zerowych świadczy o wysokim potencjale naukowym lekarz Aleksandry Turek-Jakubowskiej .

Do badania włączono 61 osób – 32 pacjentów ze świeżo rozpoznany udarem niedokrwienym mózgu oraz 29 ochotników, którzy stanowili grupę kontrolną, dobraną pod względem między innymi płci, wieku do grupy badanej. Jasno sformułowano kryteria włączenia i wyłączenia z badania.

Protokół badania obejmował pobranie materiału biologicznego dwukrotnie (1 doba [grupa A] oraz 7 doba [grupa B]) u chorych z udarem niedokrwienym potwierdzonym w CT oraz jednokrotne pobranie u osób z grupy kontrolnej [grupa C]. We wszystkich grupach



wykonano stratyfikację ryzyka sercowo-naczyniowego za pomocą konwencjonalnych markerów biochemicznych, zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2016 roku oraz analizę różnic proteomu i peptydomu osocza pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi wg schematu: grupa A vs grupa C, grupa B vs grupa C oraz grupa A + grupa B względem grupy C. Dodatkowo u każdego z uczestników (w grupie badanej dwukrotnie: w 1. i 7. dobie hospitalizacji; w grupie kontrolnej jednokrotnie) przeprowadzono nieinwazyjne badanie funkcji śródbłonna naczyniowego metodą laser doppler.

**Metodyka** pracy opisana jest przejrzysto i w sposób kompletny. Trafnie dobrane ryciny stanowią właściwą ilustrację opisu stosowanych metod. Rycina 6 opisuje protokół badania. Według mnie wymaga ona drobnych zmian edytorskich. Prostsze dla czytelnika byłoby umieszczenie kryterium czasowego i podziału na grupy na górze ryciny. Dobór metod statystycznych jest właściwy, a opis ich zastosowania prosty i wystarczający. Należy podkreślić bardzo rzetelne zebranie, jak i zabezpieczanie materiału badawczego. Bez wątplenia przyczyniło się do tego ogromne doświadczenia Promotora i zespołu w prowadzeniu tego typu badań.

**Wyniki** pracy zaprezentowano bardzo przejrzysto. Są one przedstawione klarownym, adekwatnym do rozprawy naukowej językiem, a zrozumienie najważniejszych danych ułatwia ich zestawienie w czytelnie opracowanych tabelach i rycinach. Do rozważenia poddaję kwestię przeniesienia z Wyników do części Metodyka opisu niedoskonałości elektroforezy pkt. 5.2. Na komentarz Autorki zasługują wyniki funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna w grupie kontrolnej: czy wyniki zawsze mają taką samą wartość i odchylenie standardowe? Proponuję także wyjaśnienie wyboru zastosowanych jednostek dla transaminazy alaninowej i asparaginowej (AU) w Tabeli II – w praktyce klinicznej stosuje się najczęściej jednostki międzynarodowe na litr (IU/L).

Uwagę recenzenta zwróciła także niska (na granicy różnicy statystycznej) wartość parametru „p” przy niemalże nie różniących się wartościach INR (Tabela II).

**Dyskusja** jest wyczerpująca, świadczy o dobrej znajomości lekarz Aleksandry Turek-Jakubowskiej omawianej problematyki. Na odnotowanie zasługuje zwłaszcza część „Ograniczenia pracy” świadcząca o krytycyzmie znamionującym dojrzałego naukowca.

Zachęcam Doktorantkę do przedyskutowania w czasie publicznej obrony, które z otrzymanych białek ma największą szansę być biomarkerem udaru niedokrwiennego, które natomiast może być punktem uchwytu leczenia celowanego w tej populacji chorych

Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na falsyfikację wszystkich postawionych przed badaniem hipotez zerowych, a następnie wysunięcie najważniejszych wniosków:

1. Zaobserwowano różnice w proteomie surowicy osób z udarem niedokrwiennym mózgu w porównaniu z grupą kontrolną, identyfikując białka – potencjalne biomarkery udaru, które mogą okazać się dodatkowo ewentualnymi celami terapeutycznymi lub punktami uchwytu dla nowo projektowanych leków neuroprotektcyjnych.

2. Wykazano dynamikę zmian w proteomie surowicy osób z udarem niedokrwiennym mózgu w wyznaczonym szeregu czasowym, wskazując na powiązanie określonych białek z przebiegiem choroby, co może być w przyszłości pomocne w rozpoznaniu dorzutu udaru, ale także umożliwić ocenę tempa powrotu do zdrowia.

3. Odnotowano istotne różnice fenotypu funkcji śródbłonna naczyniowego mikrokrążenia kończyn górnych między osobami zdrowymi i pacjentami z objawami udaru niedokrwiennego mózgu oraz jego zmiany w czasie, co przemawia za faktem, że choroba śródbłonna naczyniowego u osób z udarem niedokrwiennym mózgu jest ważnym elementem jego patofizjologii oraz zaburzeniem ogólnoustrojowym.

4. Zastosowanie technik analizy proteomu osocza równocześnie z oceną funkcji śródbłonna może umożliwić kompleksową ocenę czynników determinujących indywidualną zmienność funkcji śródbłonna i tym samym podatność na wystąpienie incydentów zakrzepowo-zatorowych oraz otworzyć drogę dla próby terapii śródbłonna jako leczenia etiotropowego, zmniejszającego ryzyko i rozległość udaru.

**Piśmiennictwo** jest adekwatne i pomocne dla Czytelnika zainteresowanego pogłębieniem tematu dysertacji. Należy zaznaczyć fakt powoływania się na bardzo aktualne prace.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską lekarz Aleksandra Turek-Jakubowskiej należy - niezależnie od bardzo wysokich jej walorów poznawczych - odnotować kilka faktów i szerzej je skomentować.

Uważam, że jednym z najważniejszych dokonań Doktorantki jest wykazanie różnic w proteomie surowicy chorych z udarem niedokrwiennym mózgu w porównaniu do grupy kontrolnej oraz dynamiki zmian w proteomie surowicy wskazując na ich powiązanie z przebiegiem udaru niedokrwiennego mózgu. Ponadto zidentyfikowano białka, które potencjalnie mogą być biomarkerami świeżego udaru niedokrwiennego mózgu i znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej, ponieważ są wykrywalne, tak jak w badaniu Doktorantki w surowicy pobranej w rutynowych warunkach klinicznych.

Przedstawiona praca niewątpliwie otwiera nowy kierunek badań w dziedzinie technik diagnostycznych udaru niedokrwiennego oraz stanowi zaczyn do dalszych badań w tym zakresie i dyskusji podsumowujących posiadany stan wiedzy. Myślę również, że otrzymane wyniki pozwolą na szersze ich wykorzystanie w praktyce klinicznej po pełnej walidacji zewnętrznej w większych randomizowanych prospektywnych badaniach klinicznych.

Uważam, że praca lekarz Aleksandry Turek-Jakubowskiej stanowi bardzo interesujące studium oparte na rzetelnym 'warsztacie' naukowym i niewątpliwie pogłębia naszą wiedzę o omawianym zagadnieniu oraz będzie zaliczane do ważnych opracowań w tej dziedzinie.

Podsumowując, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarz Aleksandry Turek-Jakubowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Powiązanie nowoczesnej diagnostyki pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu przy wykorzystaniu proteomiki i zaawansowanej oceny śródbłonna naczyniowego stworzyło dobrze wykorzystaną szansę na przeprowadzenie pionierskiej pracy badawczej. Proponuje zatem (z uwzględnieniem regulaminowych zasad Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu) o rozpatrzenie wyróżnienia pracy, mając na uwadze fakt, że pionierskie manuskrypty z niej się wywodzące mają duże szanse na publikacje w renomowanych czasopismach medycznych z wysokim współczynnikiem oddziaływania.

06.07. 2018

dr hab. n. med. Piotr Dobrowolski  
specjalista kardiolog

PWZ 231218A