

Prof. dr hab.n.med. Krystyna Czyżewska
Prof. Akademii Nauk Stosowanych
im. Stanisława Staszica
w Pile

Piła, dnia. 12.04. 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Alicji Sury pt.: „Wpływ leczenia trombolitycznego na metabolizm żelaza u chorych z dokonanym udarem niedokrwiennym mózgu”, napisanej pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Ewy Żekanowskiej (promotor pomocniczy dr Joanna Boinska), wykonana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzowana dysertacja liczy 153 strony pogrupowane w części typowe dla opracowań oryginalnych tj. wstęp, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki, dyskusja, wnioski i piśmiennictwo. Opracowanie zawiera również wykaz alfabetycznie zestawionych skrótów, które zostały zastosowane we wszystkich częściach pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, 51 tabel i 32 ryciny oraz załącznik w którym zamieszczono zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzone badania. Bogata bibliografia rozprawy liczy 157 pozycji, przy czym prawie połowa (77 pozycji) to publikacje z ostatnich dziesięciu lat, a większość (53 pozycje) z tych ostatnich stanowią opracowania z lat 2017 – 2022, co wskazuje na aktualność poruszanych problemów.

Podstawowy problem pracy dotyczy wskaźników metabolizmu żelaza podczas terapii niedokrwiennego udaru mózgu. Badania doświadczalne o charakterze klinicznym zostały poprzedzone analizą teoretyczną napisaną na podstawie literatury tematu, zawartą w części rozprawy określonej jako wstęp, złożony z dwóch części. Pierwsza, stosunkowo obszerna (36 stron, opracowana na podstawie 76 pozycji piśmiennictwa), dotyczy kwestii związanych z

etiopatogenezą, klasyfikacją kliniczną, czynnikami ryzyka i terapią niedokrwiennego udaru mózgu. Zawiera ponadto rozdział dotyczący profilaktyki wtórnej udaru mózgu i przemijającego niedokrwienia mózgu, które nie wiążą się bezpośrednio z celami opracowania. Druga, węższa (13 stron, wykorzystano w tym przypadku 52 pozycje piśmiennictwa) obejmuje rolę, ustrojową dystrybucję żelaza oraz jego mózgowy metabolizm. Autorka uwzględnia w niej mechanizmy kontrolujące gospodarkę żelaza i opisuje białka zaangażowane w jego metabolizm słusznie podkreślając, iż „*główną cechą, która powoduje wytworzenie mechanizmów kontrolujących gospodarkę żelazem jest jego toksyczność*”. Ponadto, przedstawia budowę bariery krew-mózg i jej zmiany w udarze mózgu, nawiązując tym samym do przedmiotu badań dysertacji.

Dane epidemiologiczne wskazują, iż udar mózgu należy do najczęstszych chorób układu krążenia. Jest jedną z zasadniczych przyczyn zgonu w populacji osób dorosłych oraz główną przyczyną długotrwałej niepełnosprawności, co niesie za sobą istotne następstwa kliniczne, socjalne i ekonomiczne. Częstość występowania jest zróżnicowana, związana z wiekiem, płcią, rejonem geograficznym oraz warunkami socjoekonomicznymi oraz wykazuje tendencję wzrostową, ze względu na starzenie się populacji.

Autorka słusznie zauważa, iż przełomem w leczeniu udaru niedokrwiennego mózgu było wprowadzenie dożylniej trombolizy oraz trombektomii i koncentruje się na tej pierwszej. Tkankowy aktywator plazminogenu (*recombinant plasminogen activator*, rt-PA) w Stanach Zjednoczonych stosowany jest od 1966 roku, w krajach Unii Europejskiej od 2002, a w Polsce od 2003 roku. Wykorzystanie tej metody jest ograniczone wieloma czynnikami określonymi jako kryteria włączenia i wyłączenia do leczenia trombolitycznego, które zostały sformułowane przez Sekcję Chorób Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Neurologicznego w 2019r. (por. s.37, 38 dysertacji). Wskazuje się na pozytywne efekty leczenia trombolitycznego, ale zgłaszane są także obawy wystąpienia powikłań. Należy do nich ukrwotoczenie zawału, które u niewielkiego odsetka

chorych leczonych trombolitycznie ma charakter objawowy. Wyniki stosunkowo nielicznych badań w tym zakresie nie są zbieżne. Częstość występowania wspomnianego powikłania określa się bowiem w granicach od kilku do kilkunastu procent. Ponadto, należy dodać, iż zaledwie kilka procent chorych z udarem niedokrwiennym mózgu kwalifikuje się do leczenia trombolitycznego, co przede wszystkim wiąże się z wąskim tzw. oknem terapeutycznym. Na ryzyko wystąpienia powikłań krwotocznych i rokowanie odnośnie przebiegu niedokrwiennego udaru mózgu ma wpływ wiele czynników m.in. stopień deficytu neurologicznego. Wskazuje się ponadto, iż stan zapasów (np. jego zwiększenie) żelaza w organizmie może być związany ze wspomnianymi powikłaniami krwotocznymi, a także złym rokowaniem u chorych z niedokrwiennym udarem mózgu, leczonych tkankowym aktywatorem plazminogenu.

Żelazo pełni w ustroju wiele funkcji, które Autorka dysertacji skrótowo przedstawiła w części poglądowej pracy. Komórkowa oraz ogólnoustrojowa homeostaza żelaza pozostaje pod wielostopniową kontrolą wielu białek, co ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania komórek i całego organizmu. Należą do nich m.in. transporter metali dwuwartościowych (*Divalent Metal Transporter*, DMT1), receptor transferyny 1, transferyna, ferrytyna, ferroportyna, hepcydyna, hemojuwelina, białko HFE (Human Hemochromatosis Protein). Białka te pełnią dwie zasadnicze funkcje. Zapewniają rozpuszczalność jonów żelazowych Fe(III), umożliwiając jego transport w płynach biologicznych oraz przez błony biologiczne do miejsc jego przeznaczenia. Ponadto, jak już wspomniano, ograniczają toksyczność żelaza, której podłożem jest katalizowana przez jony żelazawe reakcja Fentona. Powstaje podczas tej reakcji wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy uszkadzający struktury komórkowe łącznie z DNA. Jak dotąd opracowań dotyczących roli zaburzeń metabolizmu żelaza w udarze niedokrwiennym mózgu jest niewiele.

W związku z powyższym można przyjąć, iż terapia niedokrwiennego udaru mózgu jest wciąż poważnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Istnieje

więc potrzeba dalszych poszukiwań w zakresie związków przyczynowo - skutkowych towarzyszących temu udarowi, a w efekcie skutecznych i bezpiecznych metod leczenia i prognozowania przebiegu tego zaburzenia. Stąd podjęcie badań zarówno natury teoretycznej tj. przegląd i synteza danych literatury tematu, jak i doświadczalnej, obejmujących badania dotyczące identyfikacji białek związanych z homeostazą żelaza u chorych z niedokrwiennym udarem mózgu poddawanych leczeniu trombolitycznemu, uważam za słuszne i w pełni uzasadnione. Należy dodać, iż rozważania pogłądowej części rozprawy świadczą o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do podjęcia zaplanowanych badań.

Zasadniczym celem badań dysertacji była identyfikacja wybranych białek związanych z regulacją homeostazy żelaza w przypadku chorych z udarem niedokrwiennym mózgu poddanych leczeniu trombolitycznemu lub objawowemu. Postawiono także trzy cele szczegółowe. Pierwszym i drugim była ocena stężenia we krwi chorych z udarem mózgu hepcydyny, hemojuweliny, receptora transferyny i ferrytyny w zależności od etiologii udaru, lokalizacji ogniska udarowego, nasilenia deficytów neurologicznych (1 cel szczegółowy) oraz czynników ryzyka i chorób towarzyszących (2 cel szczegółowy). Trzecim z kolei celem było określenie stężenia wspomnianych białek w pierwszej (przed terapią) oraz siódmej dobie hospitalizacji w zależności od zastosowanego sposobu leczenia tj. chorych poddanych leczeniu objawowemu oraz leczeniu trombolitycznemu. Podjęte badania oceniam jako interesujące o dużym znaczeniu poznawczym. Mogą one stanowić przedmiot badań naukowych, odpowiadający potrzebom pracy doktorskiej. Zaprezentowane podejście do analizy zagadnień związanych z oceną relacji pomiędzy białkami odpowiedzialnymi za ogólnoustrojową homeostazę żelaza a sposobem leczenia niedokrwiennego udaru mózgu uznaję za oryginalne i uzasadnione teoretycznie. Istnieje bowiem potrzeba poszukiwań markerów, które wskazywałyby na skuteczność stosowanej terapii, prognozowanie jej przebiegu a

także zagrożenia wystąpienia powikłań związanych z terapią w przypadku chorych z udarem niedokrwiennym mózgu.

Wybór sposobu przeprowadzania badań i parametrów badawczych jest trafny. Procedury zaprezentowane w dysertacji, uwzględniają ważne dla interpretacji wyników i realizacji jej celów szczegóły, dotyczące m.in. parametrów antropometrycznych i cech klinicznych chorych leczonych trombolitycznie i objawowo, badań laboratoryjnych w tym metod oznaczania stężenia wybranych białek związanych z metabolizmem żelaza. Wymienione elementy świadczą o dobrej znajomości, a także wysokiej jakości tych procedur oraz obrazują szeroki zakres analiz.

Wyniki badań są wystarczająco udokumentowane i prawidłowo zaprezentowane w formie opisowej, a także w tabelach i na rycinach. Ze względu na złożoność analizowanych parametrów uważam za słuszne oraz pozytywnie oceniam wykorzystane metody statystyczne. Dla sprawdzenia rozkładu normalnego poszczególnych cech zastosowano test Shapiro-Wilka, a do analiz różnic pomiędzy badanymi parametrami w poszczególnych grupach zastosowano właściwe testy nieparametryczne - Manna-Whitneya i Kruskala-Wallisa, z kolei test chi kwadrat dla zmiennych skategoryzowanych oraz Wilcoxon dla zmiennych zależnych. Do opisu znaczenia poszczególnych czynników posłużono się wartościami ilorazu szans. Korelacje pomiędzy wybranymi parametrami oceniano za pomocą testu Spearmana, a przydatność parametrów klinicznych i biochemicznych dla klasyfikacji badanych do poszczególnych grup wykorzystano analizę regresji logistycznej jednoczynnikowej.

Przedstawiane opracowanie wnosi znaczące dane w zakresie wskaźników metabolizmu żelaza podczas terapii niedokrwiennego udaru mózgu. Dane te potwierdzają udział hemojuweliny w mechanizmach związanych z uszkodzeniem neuronów i wskazują na potrzebę dalszych w tym zakresie. Za wartościowe efekty przeprowadzonych analiz uważam elementy, które zostały wyodrębnione w części dysertacji określonej jako wnioski. Należą do nich:

- Wskazanie na istnienie związku między stężeniem rozpuszczalnej formy hemojuweliny we krwi chorych poddanych leczeniu trombolitycznemu a lokalizacją ogniska udarowego. Wartości tego stężenia były wyższe w przypadku udaru zlokalizowanego w przedniej części mózgu i poddanych trombolizie w odniesieniu do innej lokalizacji udaru i pacjentów leczonych objawowo.
- Wskazanie, na związek obniżenia stężenia hepcydyny we krwi chorych leczonych trombolitycznie lub objawowo z hamowaniem syntezy tego białka przez rozpuszczalną formę hemojuweliny.
- Wskazanie na zmiany w osi regulacyjnej hepcydyna-hemojuwelina u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, szczególnie zaznaczone w grupie chorych poddanych leczeniu trombolitycznemu.

Lektura rozprawy nasuwa też uwagi krytycznej natury;

- Zwraca uwagę niewłaściwie sformułowany cel dysertacji. Autorka napisała, iż *„Głównym celem pracy była analiza białek zaangażowanych w regulację homeostazy żelaza u chorych z udarem niedokrwiennym mózgu poddanych leczeniu trombolitycznemu i objawowemu”*. Analiza nigdy nie jest celem lecz zawsze narzędziem (metodą badawczą), które służy realizacji tego celu. Stąd cel ten powinien brzmieć *„Głównym celem pracy była identyfikacja białek zaangażowanych w regulację homeostazy.....”* Podobnie należałoby zmienić cele szczegółowe, gdzie również Autorka myli cel z narzędziem jego osiągnięcia. Ponadto, w trzecim celu szczegółowym dopisać, iż chodziło o ocenę stężenia wybranych białek (por. s. 57).
- Budzi zastrzeżenia heterogenność badanej grupy chorych z udarem niedokrwiennym mózgu oraz stosunkowo niewielka ich liczba. Zróżnicowanie dotyczyło wieku (39-93 lata), masy ciała (48-121 kg), czy też BMI (19,14-41,40 kg/m²). Grupa badanych pacjentów obejmowała ogółem 45 chorych w tym 25 osób leczonych trombolitycznie za pomocą tkankowego aktywatora

plazminogenu oraz 20 chorych leczonych objawowo. W przypadku podziału na płeć liczby te były odpowiednio niższe (por. s.70), a gdy zastosowano kolejne podziały grupy badanych np. według klasyfikacji klinicznych, wystąpienia chorób towarzyszących, czy też rodzaju zastosowanego leczenia liczba chorych była zróżnicowana od kilkunastu do pojedynczych przypadków. Brak statystycznie istotnych zależności np. między wskaźnikami metabolizmu żelaza a nasileniem deficytów neurologicznych, czy występowaniem chorób towarzyszących mogło być związane z niewielką liczbą i wspomnianą niejednorodnością grupy chorych na niedokrwienny udar mózgu. Heterogenność ta może być przyczyną trudności w interpretacji wyników badań, albowiem mogą się one nie tylko wiązać z analizowanym zaburzeniem, ale także np. z procesem starzenia się ustroju, czy nadmierną masą ciała (otyłością) badanych osób i skutkami tego procesu i zaburzenia. Poruszone wyżej problemy powinny być poddane dyskusji uwzględniającej złożoność wspomnianych oddziaływań. Niewystarczająca jest wzmianka dotycząca ograniczeń pracy zawarta w końcowej części dyskusji (por. s.123).

- W recenzowanym opracowaniu zabrakło komentarza dotyczącego różnych kryteriów włączenia i wyłączenia chorych z zawałem niedokrwiennym mózgu do leczenia trombolitycznego opisanych we wstępie dysertacji oraz zastosowanego w prezentowanych badaniach. W części pogładowej dysertacji wskazano na wytyczne Sekcji Chorób Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Neurologicznego z 2019 r. Z kolei w części badawczej zastosowano wytyczne Grupy Ekspertów Sekcji Chorób Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Neurologicznego z 2012 roku. Należy przyjąć, iż wykorzystanie obecnie już nieaktualnych wytycznych włączenia i wyłączenia chorych do badań, było związane z terminem gromadzenia materiału badawczego. Należałoby o tym napisać.
- Rozprawa na ogół jest przygotowana starannie pod względem redakcyjnym. Wystąpiły jednak usterki np. niepełne informacje na rycinach i w tabelach,

gdzie nie zawsze podano wielkość próby oraz nie wyjaśniono zastosowanych określeń i skrótów. Te ostatnie wprawdzie zostały zestawione w części pracy zatytułowanej *Wykaz stosowanych skrótów*, ale ich brak w określonych materiałach ilustracyjnych utrudnia ich analizę. Ponadto, zdaniem oceniającego dysertację występują niepotrzebne powtórzenia dotyczące tabelarycznej ilustracji wyników. Dla przykładu zbiorcza tabela 15 (str. 75) zawiera te same dane, które zostały zaprezentowane odrębnie w tabelach 12,13,14. Podobnie tabela 24 (str. 82) przedstawia dane z tabel 16-23. Dotyczy to także prezentacji stężenia parametrów metabolizmu żelaza w zależności od sposobu leczenia w pierwszej oraz siódmej dobie. Wystarczyłyby zestawienia porównawcze. W odniesieniu do części wnioskującej zauważam nieprecyzyjne sformułowanie pierwszego z wniosków. Autorka napisała iż „*Stwierdzono istotnie wyższe stężenia rozpuszczalnej formy hemojuweliny...*” Nie podała jednak w porównaniu z czym było ono wyższe. Występuje ponadto nieprawidłowość konstrukcyjna pracy, która polega na nadmiernym rozbudowaniu części zatytułowanej *Udar mózgu*. Oprócz problemów niezbędnych do realizacji celu opracowania Autorka omawia tu bowiem problemy poboczne np. profilaktykę wtórną udaru mózgu i niedokrwienia mózgu.

Przechodząc do ostatecznej konkluzji stwierdzam, iż przedstawiona przez mgr Magdalenę Alicję Sury rozprawa pt. „*Wpływ leczenia trombolitycznego na metabolizm żelaza u chorych z dokonany udarem niedokrwienym mózgu*”, zawiera oryginalny wkład badawczy i wzbogaca wiedzę w zakresie wskaźników metabolizmu żelaza podczas terapii niedokrwienego udaru mózgu. Autorka zrealizowała postawione cele. Praca została dobrze zaprojektowana koncepcyjnie i starannie wykonana, a wskazane przez recenzenta uwagi w niewielkim stopniu umniejszają osiągnięcia poznawcze rozprawy. Doktorantka udowodniła zdolność do samodzielnego formułowania i rozwiązywania ważnych problemów i sprecyzowała udokumentowane wnioski. Recenzowaną pracę oceniam jako spełniającą kryteria stawiane rozprawom

doktorskim. Stąd wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr Magdaleny Alicji Sury do dalszych etapów przewodu doktorskiego na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.



Prof. dr hab. Krystyna Czyżewska