

Olsztyn, 27 listopada 2022 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz
Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej
i Administracji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Piotra Frydrychowskiego pt. „Ocena kardioprotekcyjnego działania dowieńcowo podawanego kwasu acetylosalicylowego na świńskim modelu niedokrwienia/reperfuzji – badania in vivo”.

Podstawą prawną przygotowania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dn. 27 września 2022 r. i pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria UP we Wrocławiu z dn. 27 września 2022 r.

Rozprawa doktorska lek. wet. Piotra Frydrychowskiego została przygotowana w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu pod kierunkiem Promotor, prof. dr hab. Agnieszki Noszczyk-Nowak i Promotor dr hab. Iwony Bil-Luli, prof. uczelni, z Zakładu Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Rozprawa doktorska oparta jest o dwa opublikowane recenzowane artykuły naukowe, w których Doktorant jest pierwszym autorem:

1. **Frydrychowski, P.**, Michałek, M., Kulczkowski, W., Nowak, K., Skrzypczak, P., Bil-Lula, I. & Noszczyk-Nowak, A. (2022). The impact of a modified anaesthetic protocol on animal survival and the characteristics of ventricular arrhythmias in the course of acute myocardial infarction in a domestic pig model. *Journal of Veterinary Research*, 66 (3). <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0046> **MNiSW: 140 pkt; IF2022: 2,058.**
2. **Frydrychowski, P.**, Michałek, M., Bil-Lula, I., Chełmecka, E., Kafel, A., Noszczyk-Nowak, A., & Stygar, D. (2022). Cardioprotective Effect of Acetylsalicylic Acid in the Myocardial Ischemia-Reperfusion Model on Oxidative Stress Markers Levels in Heart Muscle and Serum. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1432. <https://doi.org/10.3390/antiox11081432> **MNiSW: 100 pkt; IF2022: 7,675.**

Zawartość merytoryczna publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska jest zgodna z tytułem pracy doktorskiej, w związku z czym rozprawa doktorska spełnia formalny warunek polegający na spójności tematycznej prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Należy zaznaczyć, że publikacje zostały wydrukowane w bardzo dobrych czasopismach o wysokim wskaźniku IF i wysokiej punktacji MNiSW. Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 9,733, a łączna liczba punktów MNiSW wynosi 240.

Zarówno informacja zamieszczona w pracach oryginalnych jak i dołączone do dokumentacji przesłanej razem z egzemplarzem rozprawy doktorskiej oświadczenia współautorów publikacji wyraźnie wskazują, że Doktorant odegrał wiodącą rolę w zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań oraz opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów prac. W tym miejscu nasuwa się tylko uwaga, że (moim zdaniem) oświadczenia te powinny zostać włączone do monografii, a nie występować w postaci osobnych dokumentów. Jeśli w monografii są zamieszczone oświadczenia Doktoranta, to również oświadczenia współautorów, kluczowe przecież dla oceny rozprawy doktorskiej, powinny się tam znaleźć.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch głównych części: polskojęzycznej części zawierającej formalne elementy rozprawy doktorskiej, w której omówione zostały szeroko zagadnienia związane z pracą dokorską oraz części zawierającej teksty publikacji w języku angielskim, będących podstawą ocenianej rozprawy.

Część polskojęzyczna składa się z ze spisu skrótów, streszczenia (również w języku angielskim), wykazu prac oryginalnych stanowiących podstawę opracowania, wstępu, gdzie Doktorant omawia zagadnienia patofizjologii niedokrwienia mięśnia sercowego i stresu oksydacyjnego oraz znaczenie kwasu acetylosalicylowego w leczeniu niedokrwienia mięśnia sercowego. Wstęp jest bardzo obszerny i wyczerpująco przedstawia zagadnienia będące przedmiotem zainteresowania Doktoranta. W następnej części Doktorant zamieścił obszerny (ale nie zbyt obszerny) spis literatury liczący dokładnie 100 pozycji. Należy zaznaczyć, że literatura jest starannie i właściwie dobrana, a większość cytowanych publikacji pochodzi już z nowego Millenium. Na podkreślenie zasługuje to szczególnie w dzisiejszych czasach, gdy swobodny dostęp do elektronicznych baz danych skłania często autorów do zamieszczania nadmiernej liczby cytowań. Ograniczenie liczby cytowanych prac świadczy z kolei o umiejętności ich krytycznej oceny i wyłowienia tych najważniejszych.

Po spisie literatury Doktorant opisał cele badań wykonanych w ramach dysertacji. Moim zdaniem należałoby zmienić kolejność celów, tak aby odpowiadały kolejności wykonanych badań eksperymentalnych.

Tutaj nasuwa się zastrzeżenie, że w części polskojęzycznej brakuje obszernego omówienia prac eksperymentalnych wchodzących w skład pracy i uzyskanych wyników. Dopełniłoby to część polskojęzyczna w logiczną całość. Odnoszenie się wyłącznie do tekstu prac oryginalnych wybija trochę z rytmu w czasie czytania i oceny rozprawy. Poza tym, tekst w pracy oryginalnej nie zawsze jest wystarczająco jednoznaczny i czytelny, zwykle ze względu na narzucane przez wydawców ograniczenia objętości publikacji. Obszerne omówienie w języku polskim pozwoliłoby zawrzeć informacje, których może brakować w tekście pracy oryginalnej.

Tutaj należy zawrzeć niewielką uwagę krytyczną. Tekst w języku polskim w niektórych miejscach wymagałby poprawek stylistycznych i językowych, oraz usunięcia fraz będących skrótami myślowymi, chociaż w niczym nie umniejsza to jego wartości naukowej.

Drugie, niewielkie, zastrzeżenie budzi zamieszczenie wniosków wyciągniętych przez Doktoranta po tekście prac oryginalnych, a nie w polskojęzycznej części rozprawy. Jednak jeśli Doktorant zrezygnował z omówienia prac oryginalnych i odesłał wprost do ich tekstu w języku angielskim, jest to zrozumiałe.

Ocena rozprawy doktorskiej opartej o opublikowane, szczególnie w dobrych czasopismach naukowych, artykuły jest zawsze trudniejsza niż ocena niepublikowanej monografii. Artykuły wchodzące w skład niniejszej rozprawy zostały poddane wnikliwej i krytycznej ocenie recenzentów zarówno co do znaczenia tematyki badawczej, wykorzystanej metodologii badań jak i uzyskanych wyników. Jeśli nawet zostaną w nich znalezione jakieś mankamenty, to ich poprawienie jest już, z reguły, niemożliwe. Recenzentowi takiej rozprawy doktorskiej pozostaje zaakceptować przedstawione publikacje i wypowiedzieć się tylko o całościach badań Doktoranta.

Przeprowadzone badania miały na celu określenie, czy kwas acetylosalicylowy podany dotętniczo w czasie cewnikowania tętnicy wieńcowej ma działanie kardioprotekcyjne w stanie ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego. W tym celu Doktorant zastosował metody oparte o pomiar poziomu markerów stresu oksydacyjnego w modelu opartym o okluzję bliższego odcinka przedniej gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej u świni.

W badaniach naukowych dotyczących mechanizmów niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego często wykorzystuje się świnię domową jako zwierzę modelowe. Gatunek ten, ze względu na podobną do ludzkiego serca anatomię, podobieństwo krążenia wieńcowego oraz mechanizmów powstawania zaburzeń rytmu stanowi świetny obiekt doświadczalny w badaniach niedokrwienia mięśnia sercowego i zawału serca u ludzi.

Procedura doświadczalna zwykle związana jest z wewnątrznaczyniowym wywołaniem okluzji naczyń, jednak w procedurach doświadczalnych zamykanie większych fragmentów naczyń wieńcowych łączy się, jak w rozległym zawale serca u ludzi, z ryzykiem zejścia śmiertelnego zwierzęcia. Dlatego też zwykle okluzja dotyczy odcinka dalszego, co jednak wywołuje zmiany mniej rozległe anatomicznie i słabiej zaznaczone czynnościowo.

Dlatego też Doktorant podjął próbę takiego zmodyfikowania postępowania anestezjologicznego o zwierzętach wykorzystywanych w modelu okluzji odcinka bliższego gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej aby uzyskać stabilny model niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego i jednocześnie zwiększyć przeżywalność zwierząt doświadczalnych.

Pierwsza publikacja (praca Nr. 1) jest pracą poświęconą właśnie opracowaniu modelu znieczulenia i postępowania anestezjologicznego pozwalającego wywołać głębokie zaburzenia funkcjonalne serca związane z jego niedotlenieniem przy jednoczesnej maksymalizacji przeżywalności.

Badania opisane w pracy Nr. 1 dotyczyły nie tylko opracowania procedury znieczulenia, ale, dysponując już niedokrwionym sercem, Doktorant wykorzystał model do opracowania charakterystyki komorowych zaburzeń rytmu serca w tak głębokim niedotlenieniu.

Wysiłki Doktoranta doprowadziły do opracowania schematu znieczulenia i postępowania śródoperacyjnego skutkującego 100% przeżywalnością zwierząt doświadczalnych. Do tej

pory trudno było uzyskać stabilny i powtarzalny model doświadczalny przy tak „wysokim” zamknięciu jednego z głównych naczyń wieńcowych. Sukces Doktoranta pozwolił jednocześnie na określenie charakteru i częstotliwości występowania zaburzeń rytmu pochodzenia komorowego, głównie tzw. częstoskurczu komorowego.

Tu nasuwa się pewna uwaga. W polskojęzycznej części rozprawy Doktorant stosuje na określenie częstoskurczu komorowego skrót VT, pochodzący od anglo-łacińskiego terminu „ventricular tachycardia”. U czytającego tekst używanie rodzaju męskiego (częstoskurcz komorowy) do skrótu VT (ventricular tachycardia), gdzie odruchowo dopatrujemy się rodzaju żeńskiego, rodzi pewien dysonans.

Po opracowaniu stabilnego modelu doświadczalnego związanego z okluzją proksymalnego odcinka gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej Doktorant przeprowadził drugą część swoich badań dotyczącą wpływu kwasu acetylosalicylowego podawanego do okludowanego naczynia (przed jego udrożnieniem) na parametry stresu oksydacyjnego w tkance mięśnia sercowego podlegającej reperfuzji.

Patofizjologia niedokrwienia mięśnia sercowego wiąże się zarówno z niekorzystnym wpływem niedotlenienia, jak i niekorzystnym wpływem zbyt gwałtownego przywrócenia drożności tętnicy wieńcowej, co (paradoksalnie) często nie powoduje powrotu perfuzji, w odróżnieniu od postępowania polegającego na stopniowym przywracaniu drożności i perfuzji.

Uszkodzenie reperfuzyjne związane jest z gwałtownym metabolizmem tlenowym metabolitów pojawiających się w niedotlenionych tkankach pod wpływem zmienionych funkcjonalnie enzymów i generowaniem reaktywnych form tlenu, które indukują stres oksydacyjny i związany z nim stan zapalny. Mechanizmy związane ze stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym odpowiedzialne są z kolei za rekrutację neutrofilów w zmienionych zapalnie tkankach i aktywację trombocytów, co uniemożliwia prawidłowy przepływ krwi przez naczynia włosowate i podtrzymuje stan hipoksji tkankowej.

Należy zaznaczyć, że zrekrutowane granulocyty obojętnochłonne same są również źródłem reaktywnych form tlenu i nasilają stres oksydacyjny w tkankach, które uległy uszkodzeniu reperfuzyjnemu.

Kwas acetylosalicylowy (ASA) jest od dawna stosowany jako lek przeciwzapalny. Jest pierwszym lekiem syntezowanym na skalę przemysłową i szeroko dostępnym w leczeniu. Produkt o nazwie „Aspiryna” był tak popularny i tak zrewolucjonizował medycynę, że nazwa handlowa stała się wręcz synonimem kwasu acetylosalicylowego. Trochę później, pewnie przez przypadek związany z reakcjami niepożądanymi, odkryto przeciwzakrzepowe działanie ASA, które objawia się skłonnością do krwawień przy długotrwałym (i nie tylko) stosowaniu dużych dawek tego leku. Właściwości antykoagulacyjne ASA zaczęto wykorzystywać w profilaktyce przeciwzakrzepowej, w tym w profilaktyce choroby wieńcowej.

Obecnie mamy dostępnych wiele preparatów stosowanych do profilaktyki przeciwzakrzepowej w kardiologii opartych o niskie dawki ASA.

Jednakże, preparaty ASA nie są pozbawione działań ubocznych. Drażniące działanie na żołądek, czy wywoływanie niedokrzepliwości są chyba tymi najważniejszymi. Do tej pory powszechnie stosowaną drogą ich podawania była droga doustna, najmocniej obciążona skutkami niepożądanymi. Rzadko, i głównie w warunkach szpitalnych, ASA podawany jest dożylnie (jako sól lizynowa). Dlatego też opracowanie nowych sposobów stosowania preparatów ASA jest tak ważne.

Jedną z ciekawszych koncepcji jest podawanie ASA bezpośrednio do naczynia wieńcowego poprzez cewnik stosowany w procedurze angioplastyki wieńcowej. Można w ten sposób podać większe dawki ASA działające miejscowo, bez wywoływania jednocześnie ogólnoustrojowych skutków niepożądanych. ASA podany miejscowo wykazuje silny skutek, jednak po rozcieńczeniu w krążeniu ogólnoustrojowym jego stężenie nie wywołuje żadnych skutków ubocznych. Metoda ta pozwala na stosowanie miejscowych stężeń ASA, które nie tylko wykazują działanie przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe, ale można wtedy również wykorzystać (słabe) właściwości antyoksydacyjne ASA, które w stężeniach uzyskiwanych po podaniu ogólnoustrojowym w bezpiecznych dawkach są pomijalne.

W pracy Nr. 2 Doktorant przeprowadził zabieg wywołania okluzji odcinka proksymalnego gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej metodą wewnątrznacyniowej (przezskórnej) angioplastyki balonikowej z potwierdzeniem uzyskania ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego za pomocą EKG. Przed udrożnieniem tętnicy, w zależności od grupy doświadczalnej, do okludowanej tętnicy podano roztwór fizjologiczny (grupa kontrolna), lub 150 mg soli lizynowej ASA (grupa badana). Od zwierząt była pobierana krew w różnych okresach po zabiegu i wycinki mięśnia sercowego (po uśmierceniu zwierząt) w celu określenia nieenzymatycznych i enzymatycznych parametrów stresu oksydacyjnego.

Wyniki uzyskane wyraźnie wykazały związek pomiędzy wystąpieniem ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego a wykrytym poziomem stresu oksydacyjnego, oraz pomiędzy poziomami parametrów określających natężenie stresu oksydacyjnego, a zastosowaniem, lub niezastosowaniem, preparatu ASA podanego bezpośrednio do naczynia wieńcowego.

We wszystkich pracach oryginalnych na szczególne uznanie zasługuje właściwie dobrana metodologia oparta o nowoczesne metody badawcze. Należy podkreślić również, że wszystkie prace wchodzące w skład pracy doktorskiej są pracami obszernymi, których lektura utwierdza recenzenta w przeświadczeniu o wysokich umiejętnościach naukowych i technicznych Doktoranta

Doktorant wyciągnął z wyników przeprowadzonych badań 6 dobrze sformułowanych wniosków, z których 3 dotyczą potwierdzenia kardioprotekcyjnego działania ASA podanego bezpośrednio do tętnicy wieńcowej, co jest kluczowym osiągnięciem Doktoranta.

Obowiązki Recenzenta polegają nie tylko (niestety) na docenianiu osiągnięć Doktoranta, ale ma on również obowiązek krytycznego spojrzenia i wyłowienia błędów oraz potknięć popełnionych w czasie prowadzenia badań i opracowywania dysertacji. Ale, powinno to być traktowane jako życzliwe zwrócenie uwagi młodszemu koledze przez kogoś bardziej doświadczonego. Dowodzi to również staranności z jaką Recenzent wykonał swoją pracę.

Niektóre uwagi krytyczne zamieściłem już wcześniej, tu skoncentruję się na niektórych drobiazgach, które nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Na stronie 19 Doktorant zalicza metale ciężkie do czynników generujących wolne rodniki. Do metali ciężkich zaliczamy zwykle ołów, rtęć i kadm, natomiast reaktywne formy tlenu są generowane przez metale przejściowe, tzn. żelazo, miedź, kobalt i nikiel, które tworzą reaktywne formy tlenu w tzw. reakcji Fentona. Doktorant pisze również o dysmutazie nadtlenkowej jako elemencie enzymatycznego układu antyoksydacyjnego, podczas gdy powinien napisać o dysmutazach nadtlenkowych, jako, że występują ich trzy rodzaje.

Na stronie 22 Doktorant twierdzi, że peroksydaza glutationowa katalizuje rozkład nadtlenku wodoru do wody i lipidów, podczas gdy istnieje kilka izoenzymów tej peroksydazy, z których niektóre rozkładają nadtlenek wodoru wykorzystując go do utleniania glutationu, a inne utleniają glutation wykorzystując nadtlenki lipidów, niejako „regenerując” w ten sposób utlenione cząsteczki lipidowe.

Te, i inne (niewymienione) drobne potknięcia i niedopatrzenia nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej opinii o rozprawie.

Pewne zaskoczenie sprawiła Recenzentowi możliwość znalezienia pewnego niedopatrzenia w pracach oryginalnych. W obu pracach Doktorant, opisując procedurę znieczulenie, pisze o intubacji i stosowaniu oddechu kontrolowanego (prawdopodobnie z wykorzystaniem respiratora stanowiącego element aparatury anestezyjologicznej), jednak nigdzie w opisie procedury znieczulenia nie wspomina o lekach zwiotczających, które powinny być zastosowane w celu wyłączenia spontanicznego oddychania, i lekach odwracających działanie leków zwiotczających.

Przedstawione powyżej uwagi krytycznie w niczym nie zmniejszają wysokiej merytorycznej oceny pracy doktorskiej. Uważam, że stanowi ona bardzo znaczący wkład w badania nad doskonaleniem metod leczenia zawału serca. Podsumowując, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień naukowy doktora. Przedstawiam zatem jej pozytywną ocenę i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Piotra Frydrychowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, chciałbym wystąpić z wnioskiem o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na jej wysoką wartość naukową.


KIEROWNIK KATEDRY
prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz