

Recenzja rozprawy doktorskiej lek.med. Alberta Stachury pt.

„Wpływ N-acetylcysteiny na gojenie ran w zwierzęcym modelu cukrzycy”

1.Podstawa formalna wykonania recenzji

Recenzję wykonano w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dn. 16.10.2024 roku powołującej recenzentów rozprawy.

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym pod kierownictwem promotora prof. dr hab. Pawła Włodarskiego oraz promotora pomocniczego dr n. med. i n. o zdr. Wiktora Pascala

2. Zasadność wyboru tematu

Zespół stopy cukrzycowej- manifestujący się najczęściej jako przewlekła rana (owrzodzenie) zlokalizowana poniżej stawu skokowego może dotyczyć nawet 15% chorych na cukrzycę. Z uwagi na znacznie wydłużony czas gojenia, częste hospitalizacje powikłanie to stanowi istotne obciążenie ekonomiczne budżetów opieki zdrowotnej (szczególnie wobec faktu wzrastającej stale liczby chorych na cukrzycę jak również wydłużenia czasu ich przeżycia) oraz jest najważniejszym czynnikiem ryzyka amputacji kończyny w tej grupie pacjentów

Jest wiele elementów wpływających na gorsze gojenie ran u chorych na cukrzycę . Z klinicznego punktu widzenia jest to między innymi zanik ochronnego czucia bólu , słabsza obrona i zwalczanie infekcji a także współistniejące u wielu chorych miażdżyca oraz niedokrwienie kończyn a na poziomie molekularnym zaburzenia dotyczące czynników wzrostu, tworzenia kolagenu, angiogenezy czy aktywności metaloproteinaz. Najnowsze zalecenia IWGDF (Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Stopy Cukrzycowej)

rekomendują jedynie tlenoterapię hiperbaryczną oraz miejscową, opatrunki z oktasianem sacharozy, preparaty zawierające autologiczne leukocyty, płytki oraz fibrynę do stosowania miejscowego oraz preparaty z komórek łożyska ludzkiego jak również terapię podciśnieniową (w przypadku ran pooperacyjnych) jako jedyne interwencje które można rozważyć w celu wspomoczenia procesu gojenia ran w przebiegu zespołu stopy cukrzycowej. Ograniczenia tych rekomendacji wynikają z braku dostatecznych dowodów naukowych na skuteczność innych metod.

Istnieje ogromna, niezaspokojona potrzeba prowadzenia badań pozwalających lepiej zrozumieć biologiczne i molekularne aspekty patofizjologii gojenia owrzodzeń oraz rozwoju nowych technologii, które mogłyby zostać zastosowane u chorych na cukrzycę i wesprzeć proces gojenia u pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej.

W potrzebę tę bardzo dobrze wpisuje się przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarza medycyny Alberta Stachury zatytułowana „Wpływ N-acetylocysteiny na gojenie ran w zwierzęcym modelu cukrzycy”.

Z uwagi na fakt, że wiele z wymienionych wyżej etapów może być zaburzonych w procesie gojenia ran u chorych na cukrzycę wybór tematyki pracy należy uznać za bardzo zasadny.

3. Ocena merytoryczna pracy

Cykl prac stanowiący podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej obejmuje dwie publikacje, które ukazały się w International Journal of Molecular Sciences

- “Wound Healing Impairment in Type 2 Diabetes Model of Leptin-Deficient Mice- a Mechanistic Systematic Review”
- “The Influence of N-acetylcysteine-Enriched Hydrogels on Wound Healing in a Murine Model of Type 2 Diabetes Mellitus”

W obu tych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem.

Pierwsza z nich to dokonany przez Autora przegląd systematyczny dotychczas opublikowanych prac, w którym – na podstawie dostępnych danych – podsumowuje molekularne podłoże procesów gojenia ran w modelach mysich z deficytem leptyny (modele db/db i ob/ob), które mogą wynikać z systemowej lub miejscowej reakcji wywołanej urazem. Omówione tu zostały zagadnienia takie jak proces angiogenezy, zaburzenia dotyczące czynników wzrostu, oraz funkcji makrofagów obserwowane w przypadkach patologicznego przebiegu procesu gojenia a także dysfunkcja migracji fibroblastów, nieprawidłowości dotyczące apoptozy komórkowej wynikające z nasilonej ekspresji czynników nasilających to zjawisko programowego obumierania komórek . Szczególne zainteresowanie budzą rozważania, w których omówiona zostaje rola zaburzonego szlaku leptyny, która jest między innymi czynnikiem mitogennym dla keratynocytów i jako taka sprzyja gojeniu rany. W tej części omówiono również potencjalną rolę w poprawie gojenia systemowej suplementacji leptyny w warunkach laboratoryjnych.

Autor wraz ze współautorami – w podsumowaniu podkreślają, że do najczęściej opisywanych patologii gojenia ran należą: wydłużenie czasu gojenia oraz – między innymi – przedłużona ekspresja cytokin prozapalnych, zaburzenia funkcji makrofagów oraz nieprawidłowości dotyczące czynników wzrostu i angiogenezy.

W powyższej pracy analizowano również i omówiono w sposób krytyczny adekwatność doboru różnych modeli laboratoryjnych oraz cechujące je różnice w odniesieniu do fizjologii gojenia ran u ludzi.

Autorzy przedstawiają także badane w publikowanych pracach interwencje mające na celu poprawę procesu gojenia, które w dalszych etapach zostały zakwalifikowane do badań klinicznych 2, 3 i 4 fazy. Takich prac, których wyniki stanowiły podstawę do zaprojektowania i prowadzenia badań klinicznych było 27.

Powyższa praca pogładowa obejmowała ponad 360 badań modelowych i 105 badań interwencyjnych i stanowi wartościowe oraz bardzo aktualne źródło informacji na temat możliwych zaburzeń procesu gojenia ran w przebiegu cukrzycy oraz ewentualnych interwencji których skuteczność warto w tym kontekście badać wybierając odpowiednie modele zwierzęce.

Druga z prac wchodzących w skład rozprawy jest pracą oryginalną, która została zaprojektowana i zaplanowana przez Autora w oparciu o przedstawioną wcześniej dogłębną analizę dotychczasowych publikacji.

Doktorant przedstawił badanie, w którym oceniał wpływ miejscowego zastosowania hydrożelu wzbogaconego N-acetylocysteiną na gojenie ran w mysim modelu cukrzycy typu 2.

Modele zwierzęce pozwalają na lepsze poznanie patomechanizmów gojenia ran oraz na ocenę nowatorskich preparatów wpływających na ten proces przed ich zastosowaniem w warunkach klinicznych u ludzi. Wybór właściwego modelu ma tutaj kluczowe znaczenie z uwagi na liczne rozbieżności dotyczące anatomii oraz patofizjologii mogące mieć wpływ na możliwość translacji uzyskanych wyników laboratoryjnych na praktykę kliniczną. Obecnie nie dysponujemy uniwersalnym modelem cukrzycowej rany przewlekłej, badania prowadzone są z wykorzystaniem różnych gatunków zwierząt a każdy z tych modeli cechuje się określonymi ograniczeniami.

Doktorant zdecydował się prowadzić swoje badania z zastosowaniem modelu mysiego db/db, w przypadku których rozwój cukrzycy wynika z punktowej mutacji genu receptora leptyny. U gryzoni w tym modelu dochodzi do rozwoju powikłań z grupy mikroangiopatii takich jak retinopatia i neuropatia obwodowa (u ludzi będąca główną przyczyną rozwoju zespołu stopy cukrzycowej) a także do wydłużenia czasu gojenia ran. Model ten jest zwierzęcym modelem cukrzycy typu 2.

Hydrożele są to systemy hydrokoloidalne składające się z wody i polimerów – Ze względu na swoje liczne właściwości znajdują coraz szersze zastosowania – również w leczeniu ran jako zmniejszające dolegliwości bólowe oraz łatwe do usunięcia opatrunki nawilżające, mogą być również nośnikami leków. Stanowią więc cenne podłoże również dla dostarczania do rany substancji o potencjalnym wpływie na proces gojenia.

N-acetylocysteina jest substancją znaną medycynie od dawna – była stosowana w sytuacjach przedawkowania paracetamolu, jako lek mukolityczny, związek ten ma również działanie antyoksydacyjne (bezpośrednie a także poprzez wpływ na regenerację glutationu) , antyapoptotyczne, wpływa też na działanie wielu enzymów (w tym proteaz) a także na poziom cytokin prozapalnych takich jak TNF- α oraz IL-1 β . Ponadto najnowsze publikacje wskazują na możliwą korzystną rolę N-acetylocysteiny w procesie gojenia ran (modele laboratoryjne). Związek ten może przyspieszać różnicowanie keratynocytów oraz akcelerować re-epitelializację jak również wpływać na wazodilatację oraz aktywację neutrofilii

Zrealizowany przez Doktoranta projekt należy uznać za innowacyjny ponieważ dotychczas opublikowane badania z N-acetylocysteiną prowadzone były tylko w modelach zwierzęcych odpowiadających cukrzycy typu 1 (hiperglikemia indukowana chemicznie z zastosowaniem alloksanu bądź streptozotocyny).

W poprzednich projektach Doktorant oceniał wpływ niskich stężeń N-acetylocysteiny podawanej w iniekcjach. Inni badacze analizowali różne zakresy stężeń od 0.03% do 20% podawane w zróżnicowany sposób.

W swojej kontrolowanej placebo pracy Autor przebadiał działanie kilku stężeń N-acetylocysteiny (5%,10% oraz 20%) uwalnianej miejscowo z hydrożelu w sposób kontrolowany w określonym przedziale czasowym. U zwierząt utworzono po cztery rany na powierzchni grzbietowej, a każdy z gryzoni służył jako własna kontrola. Dodatkowo zastosowano techniki zapobiegające występującemu w modelach mysich i szczurzych mechanizmowi obkurczania

tkanek w procesie gojenia w odróżnieniu od ran skóry ludzkiej gdzie dominuje ziarninowanie. Badacze byli zaślepieni co do rodzaju interwencji aplikowanej zwierzętom. Zastosowaną metodologią jest właściwa.

W trakcie trwania projektu monitorowano tempo gojenia ran a pobrane tkanki poddano również ocenie histopatologicznej.

We wnioskach z przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że spośród badanych stężeń N-acetylocysteiny optymalne było stężenie 5%, które spowodowało szybsze gojenie ran (zwłaszcza we wczesnych fazach- aż do końca drugiego tygodnia) najprawdopodobniej spowodowane poprawą mechanizmów proliferacji i reepitelializacji.

Jak sugerują Autorzy kolejne prace – w celu potwierdzenia obserwowanych zjawisk-warto przeprowadzić również z zastosowaniem innych modeli zwierzęcych.

W podsumowaniu należy stwierdzić że dane literaturowe przedstawione przez Autora w pracy przeglądowej uzupełnione wynikami z pracy oryginalnej w istotnym stopniu poszerzają wiedzę na temat potencjalnej roli N-acetylocysteiny jako substancji niedrogiej i bezpiecznej o możliwym korzystnym wpływie na proces gojenia ran. Wprowadzenie jej do zastosowania w ranach u ludzi wymaga jednak dalszych badań.

Prace przedstawione do oceny, wchodzące w skład rozprawy są spójne tematycznie. Ich łączny *impact factor* (IF) wynosi 9.8 a punktacja MNiSW 280 pkt. Autor ponadto wykazuje się konsekwencją jeśli chodzi o zainteresowania badawcze i prowadzone projekty.

Przedstawiona do oceny praca cechuje się właściwym, typowym układem obejmującym

- wykaz stosowanych skrótów
- streszczenie w języku polskim i angielskim
- wstęp uzasadniający wybór tematyki

- założenia i cel pracy
- kopie opublikowanych prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej
- podsumowanie oraz wnioski wynikające z przedstawionych badań
- opinię komisji etyki badań naukowych
- oświadczenia współautorów publikacji oraz
- referencje

4. Uwagi dotyczące rozprawy

Nie mam zastrzeżeń merytorycznych co do przedstawionych zagadnień, sposobu prowadzenia badań czy też doboru metodologii. Pozwalam sobie natomiast sformułować następujące uwagi.

1. Wstęp Autor rozpoczyna od krótkiego przedstawienia sytuacji epidemiologicznej dotyczącej cukrzycy oraz jej powikłania pod postacią zespołu stopy cukrzycowej. Wspomina o potrzebie wprowadzenia dodatkowych metod leczenia pisząc o chirurgicznym oczyszczeniu rany jako złotym standardzie leczenia- dla ścisłości warto jednak podkreślić, że jest to tylko jeden z elementów standardowego postępowania w terapii owrzodzeń u pacjentów z cukrzycą (tzw. „*standard of care*”) obok między innymi zwalczania infekcji, leczenia niedokrwienia a przede wszystkim odciążenia chorej kończyny.

2. Nieco zastrzeżeń budzi też aktualność niektórych z cytowanych prac. W załączonej bibliografii jest wiele pozycji opublikowanych ponad dwadzieścia lat temu.

3. Autor sformułował jeden pierwszorzędowy i trzy drugorzędowe cele pracy – w podsumowaniu i wnioskach odniósł się w sposób opisowy jedynie do wyników dotyczących pierwszorzędowego celu badawczego.

4. Doktorant stwierdza, że rozprawa doktorska powstała w oparciu o wyniki projektu z grantu studenckiego (1MN/2/MG/N/20), którego tytuł brzmi „Wpływ N-acetylocysteiny na gojenie ran chirurgicznych w modelu szczurów z

cukrzycą streptozotocynową”- podczas gdy rozprawa dotyczy badań nad modelem mysim- należałoby to w treści rozprawy wyjaśnić lub doprecyzować.

5. Autor używa nomenklatury cukrzyca typu I i cukrzyca typu II- od wielu lat stosuje się zapis cukrzyca typu 1/cukrzyca typu 2

6. W pracy znajdują się nieliczne błędy literowe (np. cukrzyca streptozocynowa zamiast streptozotocynowa w tytule grantu)

7. Ocenę recenzencką w znacznym stopniu ułatwiłaby lepsza szata edytorska- spięcie publikacji i rozprawy w jedną całość oraz ponumerowanie stron.

Powyższe uwagi nie umniejszają jednak wartości przedstawionej pracy .

5. Podsumowanie

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa pt. „Wpływ N-acetylcysteiny na gojenie ran w zwierzęcym modelu cukrzycy” autorstwa lek.med. Alberta Stachury spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)”

Doktorant wykazuje się bardzo dobrą znajomością tematu.

Rozprawa ma charakter badawczy a jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie dotyczące złożonego oraz bardzo istotnego problemu jakim jest gojenie ran w cukrzycy. Temat rozprawy jest zgodny z załączoną treścią. Cele pracy, założenia badawcze oraz metodyka są przedstawione w sposób przejrzysty i logiczny.

6.Wniosek końcowy

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. med. Alberta Stachury do dalszych etapów przewodu doktorskiego

dr hab. med. Anna Korzon-Burakowska
Zakład Prewencji i Dydaktyki
Katedra Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii
Gdański Uniwersytet Medyczny