

Białystok, dn. 16 czerwca 2023

Dr hab. n. med. Jerzy Głowiński
Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Tel. 85 8318277

Recenzja rozprawy doktorskiej
Lek. Mileny Michalskiej

pt. „Wpływ wewnątrznaczyniowego leczenia tętniaków aorty na
zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe i ich korelacja z wybranymi
parametrami stanu zapalnego i układu krzepnięcia”

Rola stanu zapalnego w rozwoju tętniaka aorty jest badana od kilkadziesiąt lat. Jednakże etiologia choroby nadal jest przedmiotem licznych badań, a pojęcia „tętniak zapalny” czy „tętniak zakażony” budzą niekończące się dyskusje. Wiele publikacji poświęcono roli neutrofili i markerom ich aktywacji.

Ponadto zauważono, że wczesny przebieg po małoinwazyjnej operacji wszczepienia stentgraftu nierzadko jest w mniejszym lub większym stopniu zaburzony przez ogólnoustrojową reakcję zapalną, z towarzyszącą gorączką i istotnie podniesionym CRP. Nadal brakuje konsensusu odnośnie postępowania doraźnego, a zwłaszcza zrozumienia skutków odległych zjawiska określanego jako PIS (post-implantation syndrome).

Lekarz Milena Michalska postanowiła zbadać szlaki aktywacji neutrofili oraz zdolność formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych NET u pacjentów z tętniakami aorty brzusznej oraz ich związek wybranych parametrów procesu zapalnego, układu krzepnięcia i układu białokrwinkowego. Wybór tematu jest bardzo ważny klinicznie i aktualny naukowo.

Za cele pracy Doktorantka przyjęła:

1. Ocenę stężeń markerów NETs przed oraz po operacji wewnątrznaczyniowej tętniaków aorty piersiowo-brzusznej.

2. Ocenę ssDNA jako markera NETs.
3. Ocenę ryzyka zgonu i hospitalizacji pacjentów z tętniakiem piersiowo-brzusznym poddanych operacji wewnątrznaczyniowej a aktywnością formowania NETs i wybranymi badaniami laboratoryjnymi.

Do ich realizacji Autorka zaprojektowała jednoośrodkowe obserwacyjne badanie, przeprowadzone w ośrodku wyspecjalizowanych w wewnątrznaczyniowym leczeniu tętniaków aorty przy pomocy stentgraftu t-Branch. Do badania zakwalifikowano 20 chorych, którym pobierano krew przed operacją a następnie w 3. i 5. dobie pooperacyjnej. Kryteria włączania i wyłączenia do badania oraz charakterystykę pacjentów przedstawiono w przejrzystych tabelach.

Od pacjentów pobierano próbki krwi, w których po dokładnie opisanym przygotowaniu oznaczano wybrane markery NETs. Ponadto ocenie poddano wybrane parametry hematologiczne oraz biochemiczne, oznaczone w zautomatyzowanych analizatorach.

Swobodnie krążące dwu- i jednoniciowe DNA okazały się bardzo czułymi biomarkerami pooperacyjnej reakcji zapalnej. Ich stężenie wzrastało kilkukrotnie i nie powracało do normy podczas obserwacji, przy czym stosunek obu frakcji pozostawał stały. Z kolei stężenie cytrulinowanego histonu H3 zachowywało się odmiennie, istotnie rosło w 3. dobie a następnie niemal wracało do wartości wyjściowych.

Interesująca jest obserwacja dynamiki wydzielania NETs z neutrofili, określona jako stężenie ssDNA i dsDNA na 1000 komórek, która wskazuje na wzrost w okresie pooperacyjnym. Z kolei wskaźnik stężenia Cit-H3 na 1000 neutrofili rośnie do 3. doby pooperacyjnej i następnie wraca do stanu wyjściowego.

Z kolei badania hematologiczne, w tym zachowanie leukocytów i trombocytów, a także wyniki oznaczania CRP i PCT są zgodne z codzienną obserwacją kliniczną. Pomimo dokładnego przebadania markerów zapalnych u żadnego pacjenta nie zdiagnozowano zespołu poimplantacyjnego, którego wszystkie kryteria diagnostyczne faktycznie zdarzają się bardzo rzadko.

Los pacjentów poddano niemal rocznej analizie. Szczegółowo przedstawiono zdarzenia medyczne, a zwłaszcza powikłania sercowo – naczyniowe, pojawiające się w

okresie pooperacyjnym. Bardzo interesujące jest spostrzeżenie, że ryzyko zgonu czy hospitalizacji rośnie proporcjonalnie do pooperacyjnej aktywacji neutrofilów.

Uzyskane wyniki wszystkich badań zostały szczegółowo omówione w godnej wyróżnienia dyskusji. W przekonujący sposób omówiono kolejne wyniki badań oraz ich implikacje kliniczne.

Najważniejsza obserwacja Autorki jest taka, że okres pooperacyjny charakteryzuje się nie tylko znacznym wzrostem neutrofilii, ale również aktywacją neutrofilii prowadzącą do uwolnienia markerów takich jak ssDNA, dsDNA i Cit-H3 poza błonę komórkową. Lek. Michalska wykazała ponadto, że Cit-H3 jest najbardziej specyficznym wskaźnikiem normalizacji uwolnienia sieci neutrofilowych w okresie pooperacyjnym.

Doktorantka słusznie zwraca uwagę na interakcje między płytkami krwi, a neutrofilami wydzielającymi NETs, co ma wpływ na pooperacyjną hemostazę i tworzenie skrzepin. Wprawdzie nie zaobserwowała korelacji między markerami NETs a badanymi czynnikami układu krzepnięcia, ale jej wyniki mogą być przyczynkiem do dalszych poszukiwań naukowych.

Na zakończenie lek. Michalska wymieniła i opisała ograniczenia swoich badań, wskazując potencjalne możliwości ich rozwiązania. Zachęcam gorąco do kontynuacji podjętego tematu.

Rozprawę kończą 3 wnioski:

1. NETs są wydzielane w odpowiedzi na złożony proces, który zachodzi po umieszczeniu stentgraftu. Wzrost powstawania NETs w fazie pooperacyjnej był niezależny od wzrostu liczby neutrofilii co świadczy o aktywacji neutrofilii.
2. Stężenie jednoniciowego DNA (ssDNA) koreluje z dsDNA co świadczy że ssDNA może być markerem NETozy.
3. Analiza badanych parametrów wykazała że ryzyko wystąpienia zgonu i hospitalizacji wzrasta w związku ze wzrostem następujących parametrów: dsDNA (w II pobraniu), ssDNA (w II pobraniu), neutrofile (w II i III pobraniu), stosunek neutrofilii do limfocytów (w II i III pobraniu). Ocena tych parametrów pomaga określić ryzyko wystąpienia powikłań pooperacyjnych.

Podsumowując, rozprawę doktorską lek. Mileny Michalskiej oceniam pozytywnie. Cele pracy zostały postawione prawidłowo. Układ pracy jest typowy, praca jest napisana w sposób czytelny, przejrzysty i przyjemny dla odbiorcy. Zastosowana metodyka pracy jest odpowiednia. Wyniki tej pracy nie budzą zastrzeżeń. Sformułowane adekwatnie wnioski odpowiadają osiągniętym wynikom badań i założonej hipotezie. Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i wartościowy dorobek naukowy. Jest również cennym przyczynkiem do lepszego poznania efektów wewnątrznaczyniowego leczenia tętniaków aorty. Chcę wyraźnie podkreślić walory poznawcze, aktualność problematyki badań oraz twórczy wkład lek. Michalskiej w rozwój chirurgii naczyniowej.

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić trzy uwagi, raczej redaktorskie niż merytoryczne, które nie zmieniają jak najbardziej pozytywnego odbioru pracy, ale mogą być pomocne podczas dalszej pracy nad tekstem:

1. nazwy „stent” i „stengraft” nie są równoważne i nie powinny być używane zamiennie.
2. Trzeci cel pracy jest niefortunnie sformułowany, druga część zdania złożonego nie do końca odpowiada pierwszej.
3. D-dimer jako marker degradacji fibryny oceniany jest stężeniem, a nie liczony, jak np. płytki krwi czy neutrofile. Stąd tworzenie liczby mnogiej „D-dimery” jest nieprawidłowym neologizmem.

Podczas czytania tekstu rozprawy nasunęły mi się dwa pytania, na które chciałbym usłyszeć odpowiedź:

1. we wstępie Doktorantka podkreśla, że reakcja zapalna organizmu na wszczepienie stentgraftu zależy od rodzaju implantu i materiału z jakiego jest zbudowany stentgraft. Czy mogłaby wyjaśnić szerzej jaki rodzaj i materiał ma na myśli? Czy celowe byłyby badania porównawcze odpowiedzi zapalnej przy użyciu przedstawionej metodologii?
2. Nie do końca rozumiem podanie doustnych leków przeciwkrzepliwych jako kryterium wyłączonego i włączenie do badania pacjenta przyjmującego AVK. Czy chodzi o odmienny wpływ na aktywację neutrofilów? Jeśli tak, to warto podjąć ten temat w dyskusji.

Rozprawa doktorska lek. Mileny Michalskiej spełnia warunki określone w art 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Jest to pierwsze w świecie badanie roli procesu netozy po operacji wewnątrznaczyniowej tętniaka aorty piersiowo-brzuszej. Praca jest oryginalna, napisana dojrzałe i wyczerpująco omawia zgłębiany przedmiot. W dobie ekspansji technik małoinwazyjnych temat jest bardzo atrakcyjny, a Doktorantka bardzo umiejętnie połączyła bogate doświadczenie kliniczne z zaawansowanym warsztatem naukowym.

Dr hab. n. med. Jerzy Głowacki
specjalista chirurgii ogólnej, naczyniowej
i transplantologii klinicznej